



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ZMĚNY V OBSAHU PROTEINŮ
GLIADINOVÉ FRAKCE U ČTYŘ ODRŮD
PŠENICE PŘI RŮZNÝCH TEPLOTÁCH
A STRESU SUCHEM

CHANGES IN GLIADIN CONTENT IN FOUR VARIETIES OF WHEAT
AT DIFFERENT TEMPERATURES AND DROUGHT STRESS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTERS'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michaela Cigánková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1264/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Michaela Cigánková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Změny v obsahu proteinů gliadinové frakce u čtyř odrůd pšenice při různých teplotách a stresu suchem.

Zadání bakalářské práce zadání:

Na základě studia literatury napsat pojednání o vlivu teploty a sucha na složení a obsah lepkových bílkovin u pšenice seté. Zvláště se zaměřit na změny v obsahu gliadinů.

V experimentální části sledovat obsah proteinů gliadinové frakce u čtyř odrůd pšenice v závislosti na teplotě v interakci se suchem.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Michaela Cigánková
student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vlivem rostoucí teploty a nedostatku vody na obsah gliadinových proteinů u čtyř odrůd pšenice seté: Bohemia, Pannonia, Tobak a RGT Reform. Vzorky byly kultivovány při 26, 29, 32, 35, 39 a 41 °C. Kvůli nedostatku vzorků z kultivace při 41 °C tyto vzorky nebyly pro náš experiment použity. Kultivace probíhala v době kvetení při dostatku vláhy (s vlhkostí půdy vyšší než 70 %) nebo při stresu suchem (s vlhkostí nižší než 30 %). Pro separaci gliadinových frakcí byla využita metoda A-PAGE. Kvantifikace byla provedena počítačovou denzitometrií. Byl zjištěn výrazný vliv dostupnosti vody na obsah lepkových proteinů. Stresové prostředí vytvořené nedostatkem vláhy způsobilo relativní nárůst gliadinových frakcí ve srovnání s pěstováním v běžných podmínkách především u odrůdy Pannonia a RGT Reform. Na teplotu nejvíce reagovala odrůda Pannonia a RGT Reform, nejméně pak odrůda Bohemia. Odrůda Tobak reagovala na teplotu až v interakci s nedostatkem vody. Vlivem rostoucí teploty docházelo k nárůstu množství prakticky všech gliadinových frakcí u odrůdy Pannonia a RGT Reform. Vliv sucha se často projevuje v interakci s vlivem teploty. Nejvýrazněji se projevoval vliv sucha v interakci s teplotou u odrůdy Tobak, kdy docházelo ke zvýšení obsahu gliadinů. Obecně se dá říct, že nejvíce se teplota i sucho projevilo na γ -gliadinových frakcích všech čtyř odrůd pšenice seté.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with an influence of increasing temperature and water shortage on the content of gliadin proteins in four varieties of wheat: Bohemia, Pannonia, Tobak and RGT Reform. Samples were cultivated at 26, 29, 32, 35, 39 and 41 °C. Due to the lack of culture samples at 41 °C, these samples were not used for our experiment. Cultivation took place during flowering with sufficient moisture (with soil moisture higher than 70%) or under drought stress (with humidity below 30%). The A-PAGE method was used to separate gliadin fractions. Quantification was performed by computer densitometry. Significant influence of water availability on gluten protein content was found. The lack of moisture in the stress environment caused a relative increase in gliadin fractions compared to conventional conditions, especially in the Pannonia and RGT Reform varieties. The Pannonia and RGT Reform varieties responded most to the temperature, while Bohemia. The Tobak variety responded to the temperature in interaction with water scarcity. Due to the rising temperature, virtually all gliadin fractions in the Pannonia and RGT Reform varieties increased. The effect of drought often manifests itself in interaction with the influence of temperature. The most dramatic effect was the drought in interaction with temperature in the Tobak variety, where the gliadin content increased. In general, the temperature and drought were most affected by γ -gliadin fractions of all four varieties of wheat.

KLÍČOVÁ SLOVA

Teplota, sucho, gliadiny, pšenice, lepek, A-PAGE

KEYWORDS

Temperature, drought, gliadins, wheat, gluten, A-PAGE

CIGÁNKOVÁ, M. *Změny v obsahu proteinů gliadinové frakce u čtyř odrůd pšenice při různých teplotách a stresu suchem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019, 64 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že diplomová práce byla vypracovaná samostatně a že všechny použité literární zdroje byly správně a úplně citovány. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Velice ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce, panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D., za veškerou pomoc, podporu, cenné rady, připomínky a materiály, za věnovaný čas, vstřícnost a odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala panu Ing. Karlu Klemovi, PhD. za pomoc s vyhodnocením výsledků, přínosné rady a užitečné konzultace při zpracování výsledků.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Globální klimatická změna	9
2.2	Skleníkový efekt	9
2.3	Vliv globální klimatické změny na rostliny.....	11
2.3.1	Vliv koncentrace CO ₂	11
2.3.2	Vliv teploty.....	12
2.3.3	Vliv sucha.....	12
2.3.4	Vliv na anatomii rostlin.....	13
2.3.5	Vliv na fotosyntézu, fotorespiraci a vodivost průduchů	13
2.4	Význam pšenice	13
2.5	Morfologie pšeničného zrna.....	14
2.6	Pšeničné proteiny	15
2.6.1	Albuminy a globuliny.....	17
2.6.2	Lepkové proteiny.....	18
2.6.2.1	<i>Gliadiny</i>	18
2.6.2.2	<i>Gluteniny</i>	20
2.7	Nemoci spojené s lepkem	21
2.7.1	Alergie na lepek	22
2.7.2	Celiakie.....	22
2.7.3	Neceliacká citlivost na lepek.....	24
2.8	Pšeničné proteiny a kvalita těsta	24
2.8.1	Tvorba těsta	24
2.8.2	Kvalita těsta.....	24
2.9	Vliv globálních klimatických změn na pšenici	25
2.9.1	Vliv na škrob v zrně	26
2.9.2	Vliv na bílkoviny v zrně.....	26
2.9.3	Vliv na kvalitu pšenice	27
2.10	Stanovení obsahu lepkových proteinů	27
2.10.1	Stanovení obsahu gliadinů – A-PAGE.....	29
2.10.2	Stanovení obsahu gluteninů – SDS-PAGE	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
3.1	Materiál	31
3.2	Stanovení obsahu gliadinů – A-PAGE.....	32
3.2.1	Přístroje	32
3.2.2	Chemikálie	32

3.2.3	Příprava roztoků	32
3.2.3.1	<i>Extrakční roztok pro gliadiny</i>	32
3.2.3.2	<i>0,15% vodný roztok síranu železnatého</i>	33
3.2.3.3	<i>10% vodný roztok peroxodisíranu amonného</i>	33
3.2.3.4	<i>Gelový tlumivý roztok</i>	33
3.2.3.5	<i>Elektrodotový tlumivý roztok</i>	33
3.2.3.6	<i>Fixační roztok</i>	33
3.2.3.7	<i>Barvicí roztok</i>	33
3.2.4	Příprava vzorků	33
3.2.5	Příprava polyakrylamidového gelu	33
3.2.6	Elektroforéza	34
3.2.7	Fixace a vizualizace bílkovin	34
3.2.8	Vyhodnocení gelů	34
3.2.9	Statistické zpracování výsledků	35
4	VÝSLEDKY	36
5	DISKUSE	53
6	ZÁVĚR	57
7	LITERATURA	58
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	64

1 ÚVOD

V současné době můžeme pozorovat výrazné změny klimatických podmínek po celém světě. Jedná se především o změny teploty, neustále rostoucí koncentraci skleníkových plynů v ovzduší, převážně pak CO₂, stále častější vlny veder a s tím spojená sucha. Všechny tyto změny jsou způsobené převážně lidskou činností. Díky těmto změnám jsou rostliny vystavovány stresovým podmínkám, které přímo zasahují do jejich metabolismu, kdy největší vliv mají právě zmiňovaná vysoká teplota a nedostatek vody. Vzhledem k tomu, že je třeba zajistit výživu pro stále rostoucí lidskou populaci, je nutné pozorovat tyto změny klimatu, sledovat jejich vliv na rostliny a hledat způsoby zajištění dostatku potravy.

Za nejvýznamnější hospodářskou plodinu je považována pšenice, jakožto hlavní zdroj živin pro většinu populace. Proto, je také středem zájmu mnoha výzkumů. Celoroční výnosy pšenice se pohybují okolo 550 milionů tun. Jelikož je pšenice velice adaptabilní, pěstuje se na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy. Z pšenice se získává mletím mouka, která je hlavní surovinou pro výrobu základních potravin, jako je pečivo, těstoviny, nepečené produkty, trvanlivé a další potraviny.

Nejdůležitějšími pšeničnými proteiny jsou lepkové proteiny, které tvoří ve vodě nerozpustnou elastickou složku těsta. Dělí se na monomerní gliadiny a polymerní gluteniny. Lepkové proteiny významně ovlivňují kvalitu těsta a výsledných produktů, kdy záleží na poměru, zastoupení a obsahu gliadinových a gluteninových frakcí.

I když je kladen velký důraz na kvalitu pšenice pěstované k potravinářským účelům, i přes množství výzkumů zabývajících se vlivem klimatických změn na pšenici, máme stále ještě málo informací o účinku vysokých teplot a sucha na obsah lepkových proteinů v zrně. To je způsobeno tím, že výzkumy často přinášejí protichůdné závěry.

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv rostoucí teploty a nedostatku vody, včetně vlivu teploty v interakci s nedostatkem vody, na gliadinové proteiny čtyř odrůd pšenice seté, porovnání rozdílů v zastoupení jednotlivých frakcí mezi odrůdami a sledování odpovědí jednotlivých odrůd na stresové podmínky. Pro stanovení obsahu gliadinů v zrně byla použita kyselá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (A-PAGE).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Globální klimatická změna

Globální změna klimatu označuje dlouhodobou změnu klimatických parametrů nebo jeho vlastností od průměrů přetrvávajících několik desítek let i déle. Jedná se o přirozený jev, avšak oproti minulosti tyto změny nejsou pozvolné, ale velice rychlé. K výrazným změnám docházelo pouze během opakujících se dob ledových [1].

Klima je jedním z rozhodujících faktorů našeho života. Na klimatu závisí hlavně množství vody a zemědělství, které produkuje potraviny pro lidstvo. Globální podnebí je ovlivněno řadou krátkodobých i dlouhodobých faktorů, mezi které patří kontinentální pohyby, změna kvality a množství slunečního záření, sklon osy Země, sopečná činnost, dopad meteoritů a komet, změna cirkulace a složení vod oceánů a atmosféry, kácení lesů a v neposlední řadě změny ekosystémů [2].

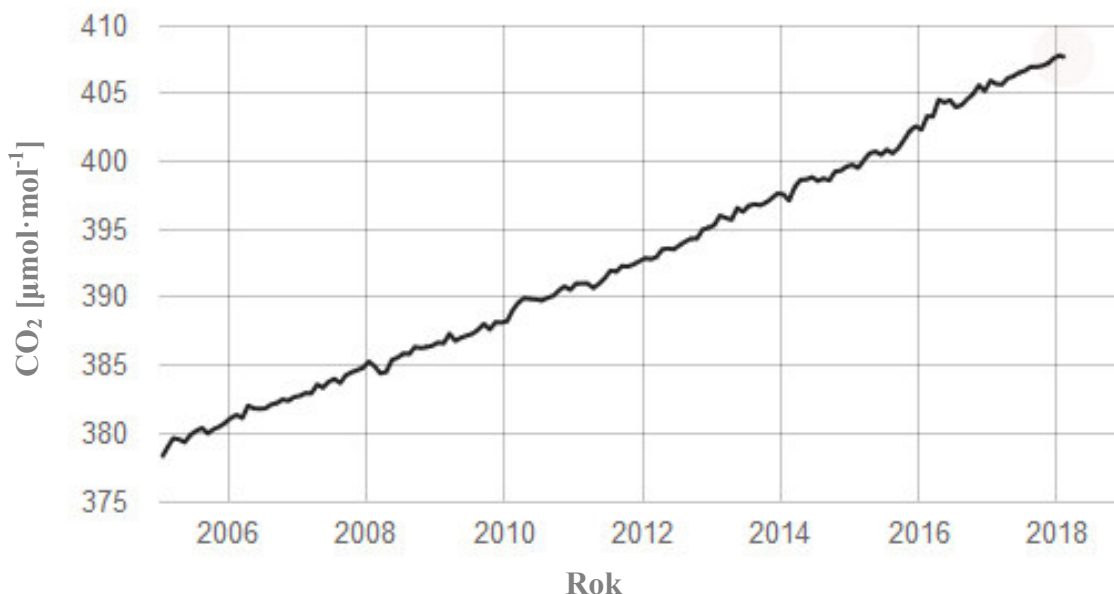
2.2 Skleníkový efekt

Globální podnebí je ovlivněno řadou krátkodobých i dlouhodobých faktorů, mezi které patří také koncentrace skleníkových plynů. Mezi skleníkové plyny patří vodní pára, oxid uhličitý, oxid uhelnatý, oxidy dusíku, metan a freony. Skleníkové plyny hrají velice důležitou roli, jelikož zachycují teplo. Jsou propustné pro krátkovlnné složky slunečního záření, ale už podstatně méně propustné pro dlouhovlnné složky infračerveného záření produkované zemským povrchem jak je znázorněné na obrázku 1 [2]. Nebýt skleníkových plynů, průměrná teplota na planetě by byla nižší přibližně o 30 °C oproti skutečné. Čím je tedy vyšší koncentrace skleníkových plynů v atmosféře, tím intenzivněji se globálně mění klima. Tento nárůst koncentrace skleníkových plynů v atmosféře je způsoben především průmyslovým spalováním fosilních paliv (uhlí, ropa, zemní plyn), čímž roste koncentrace CO₂ ve vzduchu. Rovněž zemědělství, lesnictví a doprava, podstatně přispívají k neustálému nárůstu emisí [1][3].



Obrázek 1: Princip skleníkového efektu [2].

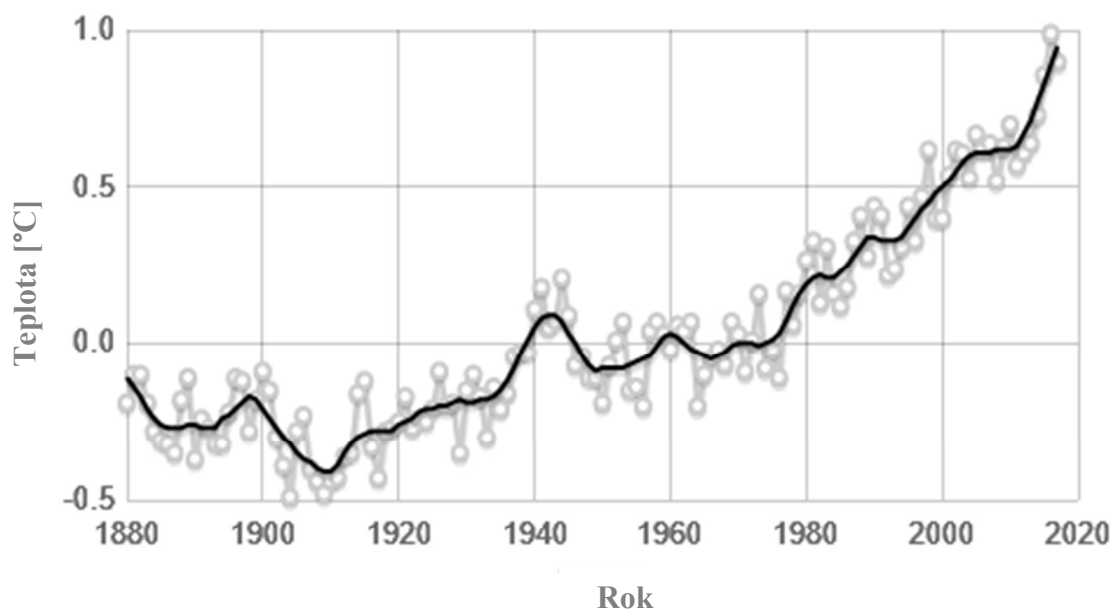
Mezi atmosférou, oceány a biosférou působí sice zpětnovazebné mechanismy, které mohou měnit rychlost produkce a odbourávání skleníkových plynů v atmosféře, avšak oceány pomalu ztrácí schopnost pohlcovat CO₂. Pro názornost v 60. letech minulého století dokázaly oceány pohltit až 30 % tohoto plynu, oproti tomu v roce 2006 tato schopnost poklesla na 25 %. Je to způsobeno právě tím, že množství absorbovaného uhlíku se neustále zvyšuje jak v pevnině, tak v oceánech, jelikož roste globální koncentrace skleníkových plynů. Opět pro názornost, v 18. století byla koncentrace CO₂ v atmosféře 270–280 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, v roce 2010 byla tato koncentrace o 35 % vyšší, tedy 390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ a dnes je tato koncentrace vyšší dokonce o 46 %, tedy 410 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ a neustále roste, jak ukazuje obrázek 2 [2][4].



Obrázek 2: Nárůst koncentrace CO₂ v atmosféře během posledních 12 let. Převzato a upraveno podle [4].

Ke globálním klimatickým změnám docházelo i v dávné minulosti v důsledku změn koncentrace CO₂ v atmosféře. Tyto změny nastávaly během přechodu mezi dobou ledovou a meziledovou a byly doprovázeny zvýšením koncentrace CO₂ při nástupu doby meziledové a poklesem koncentrace CO₂ při nástupu doby ledové. Tyto změny byly naprosto běžné a souvisely s pomalými změnami biologické produktivity, alkality oceánů, se stupněm pokrytí ledovců a změnami korálových útesů. Nedochází tedy v dnešní době k ničemu neobvyklému, problémem je však rychlost, s jakou se zvětšuje množství přítomného CO₂ v ovzduší [5].

Podle NASA se teplota na Zemi za období 1880–2017 zvýšila průměrná teplota o 0,9 °C [4]. Tento nárůst je více patrný při denních minimech než maximech, což má za následek snížení denního teplotního rozsahu. Trendy ukazují, že se snižuje počet extrémně mrazivých dnů, ale také počet extrémně teplých dnů [6]. Vývoj teplot na Zemi v letech 1880–2017 je graficky znázorněn na obrázku 3. Došlo také ke zvýšení dešťových srážek ve středních a vyšších zeměpisných šířkách, naopak v tropických a subtropických oblastech se množství srážek snížilo. Prodlužuje se jak mrazové, tak vegetační období. Je větší sucho a jsou častější vlny horka. Vzhledem k tomu lze očekávat rozšiřování pouští a další změny i v extrémních meteorologických jevech. To vše by mělo dopad na celý systém ať už hospodářský, sociální nebo i přírodní [4][6].



Obrázek 3: Graf znázorňující teplotní změny na Zemi vzhledem k průměrným teplotám v letech 1880-2017. Převzato a upraveno podle [4].

Vlivem rostoucí koncentrace skleníkových plynů dochází nejen k oteplování vzduchu, ale také pevnin a oceánů. Dalšími důsledky je okyselení oceánů, tání ledovců, zvyšování hladiny oceánů, ohřívání vody oceánů, častější a intenzivnější přívalové deště a vlny veder, změna množství a výskytu srážek, přibývání silných a intenzivních tropických hurikánů a tajfunů, vichřic, povodní, ohrožení zániku některých ekosystémů (korálové útesy, severské lesy), objev nových škůdců a chorob, snížení výnosů ze zemědělství, zrychlení fotosyntézy, nedostatek pitné vody a celkové zhoršení kvality vody a řada dalších [3][4].

2.3 Vliv globální klimatické změny na rostliny

Tak jako lidské tělo špatně reaguje na klimatické změny, stejně je tomu i u rostlin. Teplo ovlivňuje metabolismus rostlin, tedy schopnost rostlin provádět fotosyntézu, fotorespiraci a s tím souvisí také vodivost průduchů. Předpokládá se, že díky vysokým teplotám a obdobím sucha bude kladen stále větší důraz na produkci potravin.

Primární práce rostlin je výživa a růst. Vodu čerpají ze svých kořenů a zásobují tak celou rostlinu. Nadbytečnou vodní páru vyplavují průduchy, aby ochlazovaly rostlinu, a zároveň jimi pohlcují oxid uhličitý, který společně s vodou používají na tvorbu sacharidů [7].

2.3.1 Vliv koncentrace CO_2

Za posledních deset let průměrně naroste koncentrace CO_2 v atmosféře o $1,9 \pm 0,5$ ppm za rok. Díky zvýšení koncentrace CO_2 dochází k potlačení rychlosti fotorespirace rostlin, rostliny rychleji rostou a zrychluje se také produkce biomasy [2].

Mezi přímé účinky zvýšené koncentrace CO_2 v atmosféře patří změna rychlosti fotosyntézy, fotorespirace, transkripce, ale i další sekundární změny, jako jsou třeba odlišnost ve vodivosti průduchů, změna plochy listů nebo třeba nárůst kořenové biomasy [5]. Do jaké míry se tyto účinky projeví, záleží na rostlinném druhu a podmínkách růstu, jako jsou teplota, dostatek slunečního svitu, dostupnost minerální výživy a podobně [2].

2.3.2 *Vliv teploty*

Rostliny reagují na změny teploty. Vlivem velmi vysokých teplot dochází k vážným poškozením rostlinných buněk a k jejich rychlé buněčné smrti. Jsou-li teploty jen mírně zvýšené, změny se projevují až při dlouhodobém vystavení těmto podmínkám. Jak trvalé, tak přechodné vysoké teploty způsobují řadu morfologicko-anatomických, fyziologických a biochemických změn v rostlinách. Tyto změny ovlivňují růst a vývoj rostliny a mohou vést až k drastickému snížení ekonomického výnosu rostliny. Například při klíčení semen může vysoká teplota zpomalit nebo zcela zabránit klíčení. Nárůst globální teploty má za následek zvýšení respiračních procesů, díky kterým dochází ke snížení uhlíku vázaného v suchozemských ekosystémech [2]. Vysoká teplota může také nepříznivě ovlivnit fotosyntézu, respiraci, vztahy s vodou a stabilitu membrány. Dále může měnit hladiny hormonů a primárních i sekundárních metabolitů rostlin. Mezi přímé důsledky působení vysokých teplot patří denaturace a agregace proteinů a zvýšená propustnost lipidových membrán. Nepřímo je ovlivněna aktivita enzymů v chloroplastech a mitochondriích rostlin jejich deaktivací, dochází k inhibici syntézy proteinů, jejich degradaci a ke ztrátě membránové integrity. Krátkodobá expozice ve fázi plnění semena zrychluje jeho stárnutí, snižuje počet a váhu semene a redukuje výtěžnost. Při vystavení vysokým teplotám při kvetení může dojít ke sterilitě rostlin [8].

Teplota ovlivňuje také aktivitu enzymu Rubisco, který katalyzuje první krok ve dvou kompetitivních drahách, kterými jsou fotosyntéza a fotorespirace. Teplota snižuje aktivovaný stav enzymu, díky čemuž dochází k inhibici fixace CO_2 z atmosféry a tedy k inhibici fotosyntézy [8].

2.3.3 *Vliv sucha*

Vlivem klimatických změn dochází k vzniku častějších a intenzivnějších přívalových dešťů a vln veder a ke změně množství a výskytu srážek [3]. Srážky jsou nerovnoměrné a stále častěji dochází v průběhu roku k příchodu vln sucha. Rostliny tedy mají omezený přísun vody v půdě, což je omezuje v růstu a transpiraci, tedy výdejem vody povrchem listu. Při nedostatku vody v listu dojde ke ztrátě turgoru svěracích buněk a díky tomu se uzavřou průduchy, aby rostlina neztrácela vodu. Zároveň však dojde k omezení příjmu CO_2 , čímž se sníží rychlost fotosyntézy a v důsledku toho se sníží množství vyprodukovaných sekundárních metabolitů. Kromě ztráty turgoru je stimulována syntéza a uvolňování kyseliny abscisové v listech. Jedná se o hormon, který působí na svěrací buňky, čímž napomáhá udržovat zavřené průduchy. Trvá-li sucho příliš dlouho, dojde k narušení pletiva rostliny a tím k nevratnému přerušení transportu vody. Rostlina předčasně hyne. Také dělení buněk je závislé na turgoru. Nedostatek vody inhibuje růst mladých listů. Zpomalí se tak nárůst listové plochy, takže dochází i k menším ztrátám transpirací. Všechny tyto děje pomáhají rostlině sice zvládnout vodní stres, ale zároveň dochází k omezení fotosyntézy, proto je ohrožena úroda a snižují se výnosy [2][9].

2.3.4 Vliv na anatomii rostlin

Změny v anatomii rostlin jsou podobné jak při působení vysokých teplot, tak při suchu. Dochází k zmenšování buněk rostliny, uzavírání průduchů a tím pádem k omezení vodních ztrát, ale i k omezení fotosyntézy a fotorespirace. Jelikož rostlina neobsahuje příliš mnoho vody, v důsledku sucha, zvyšuje se hustota průduchů, trichomů a velikost xylémových cév kořínků a výhonků a zmenšuje se plocha listu [10]. Dochází k modifikaci chloroplastů, což opět souvisí se změnami v průběhu fotosyntézy. Mění se struktura thylakoidů, snižuje se jejich počet v granech nebo dochází naopak k jejich bobtnání. V důsledku těchto změn se narušuje anténní struktura fotosystému II, čímž je omezena fotosyntéza a fotorespirace [8].

2.3.5 Vliv na fotosyntézu, fotorespiraci a vodivost průduchů

Vysoká teplota může nepříznivě ovlivnit fotosyntézu, fotorespiraci, vztahy s vodou a stabilitu membrány. Obsah CO_2 ve vzduchu každoročně vzrůstá. Současná koncentrace je limitující při dostatečném záření, jelikož rychlost fotosyntézy roste až do $1000 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ CO_2 ve vzduchu. Odhaduje se, že během 21. století dojde téměř k zdvojnásobení koncentrace CO_2 ve vzduchu z dnešních 400 ppm na 700 ppm. Důsledkem bude rychlejší fotosyntéza, s čímž bude souviset také větší spotřeba vody. Protože listy obsahují v mezibuněčných prostorech až o 50% méně CO_2 oproti normálnímu stavu, dochází k omezené difúzní vodivosti CO_2 v listech. Jestliže rostlina vadne, uzavírá průduchy, aby nedocházelo k dalším ztrátám vody, a zároveň do rostliny nevstupuje CO_2 . Pokud se tomu tak stane během dne za vyšších teplot, může se projevit pokles rychlosti fotosyntézy. Tento pokles může být spojen také s vyšší koncentrací asimilátů (cukrů), které se hromadí v listech [11].

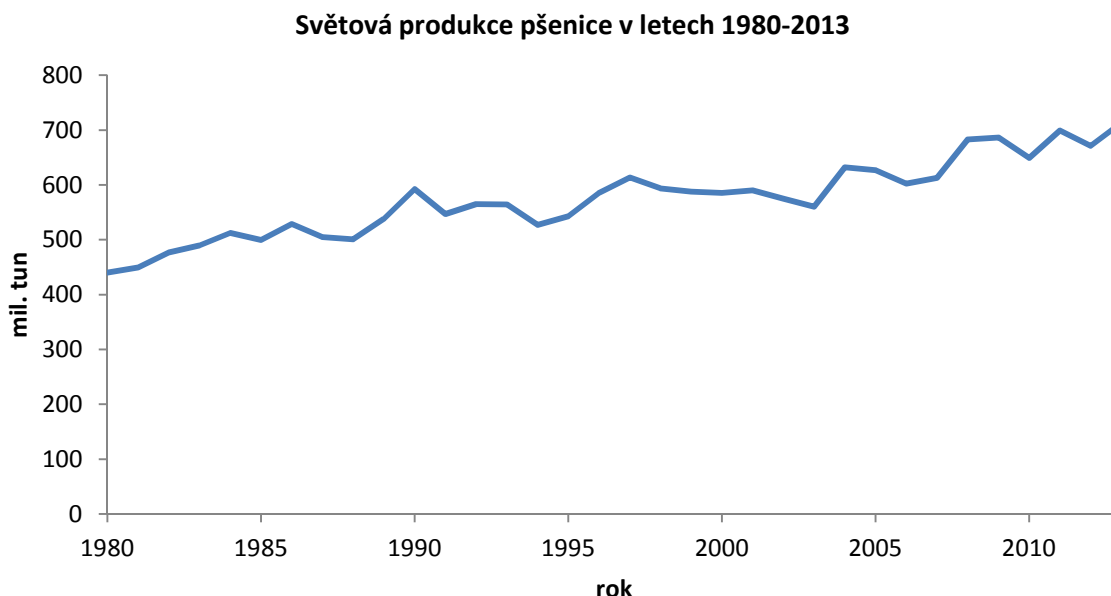
Zvýšená koncentrace CO_2 v atmosféře může vést u mnoha rostlin k aklimační depresi, což je jev, kdy počáteční stimulace fotosyntézy působením zvýšené koncentrace CO_2 klesá nebo mizí v časové periodě týdnů či měsíců. Významným faktorem zodpovědným za existenci aklimační deprese je porušení rovnováhy mezi produkcí a akumulací asimilátů. Především akumulace cukrů v asimilačním pletivu je častým důsledkem dlouhodobě působící zvýšené koncentrace CO_2 . Při výrazné kumulaci cukrů v chloroplastech může dojít k jejich popraskání a tím k přímému poškození funkce [11]. Fotorespirace je ovlivněna koncentrací CO_2 , teplotou a osvětlením. Při vyšší koncentraci CO_2 probíhá spíše fotosyntéza, naopak při vyšší teplotě a radiaci se zvyšuje pravděpodobnost fotorespirace [12].

2.4 Význam pšenice

Pšenice je celosvětově rozšířená plodina pěstovaná téměř tři tisíce let. Pěstuje se od 40° jižní šířky do 60° severní šířky. Světová produkce pšenice je ze všech obilnin největší, což vypovídá o jejím významu. To platí i v rámci České republiky. Zrna pšenice mohou být rozemleta na mouku, semolinu atd. Tvoří základní ingredience pekárenských produktů, těstovin a dalších potravin. Obilky se využívají na výrobu krupice a pšeničného škrobu, při jehož výrobě zbývá pšeničný lepek. Lepek se využívá pro výrobu polévkového koření, přípravků pro diabetiky a jiné. Pšeničný škrob se využívá k výrobě pudrů, zasýpacích prášků, dětských mouček, k výrobě dextrinu a ke škrobení prádla. Přidává se do léků a je indikátorem v jodometrii. Rod pšenice zahrnuje 24 druhů. Praktické využití mají jen tři z nich: pšenice

obecná (*Triticum aestivum* L.), pšenice tvrdá (*Triticum durum* Desf.) a pšenice naduřená (*Triticum turgidum* L.) [13][14].

Roční světová produkce pšenice (obrázek 4) činí asi 550 milionů tun a zaujímá plochu přes 800 tisíc hektarů. Produkce pšenice se neustále zvyšuje. V České republice se produkce pšenice pohybuje okolo 3,7–3,8 mil. tun za rok. K průmyslovému zpracování jsou určena pouze 2 % vyprodukované pšenice, která se zkrmuje (pšeničný škrob a otruby), menší množství se exportuje [14][15].



Obrázek 4: Graf celosvětové produkce pšenice v letech 1980 až 2013. Převzato a upraveno podle [16].

2.5 Morfologie pšeničného zrna

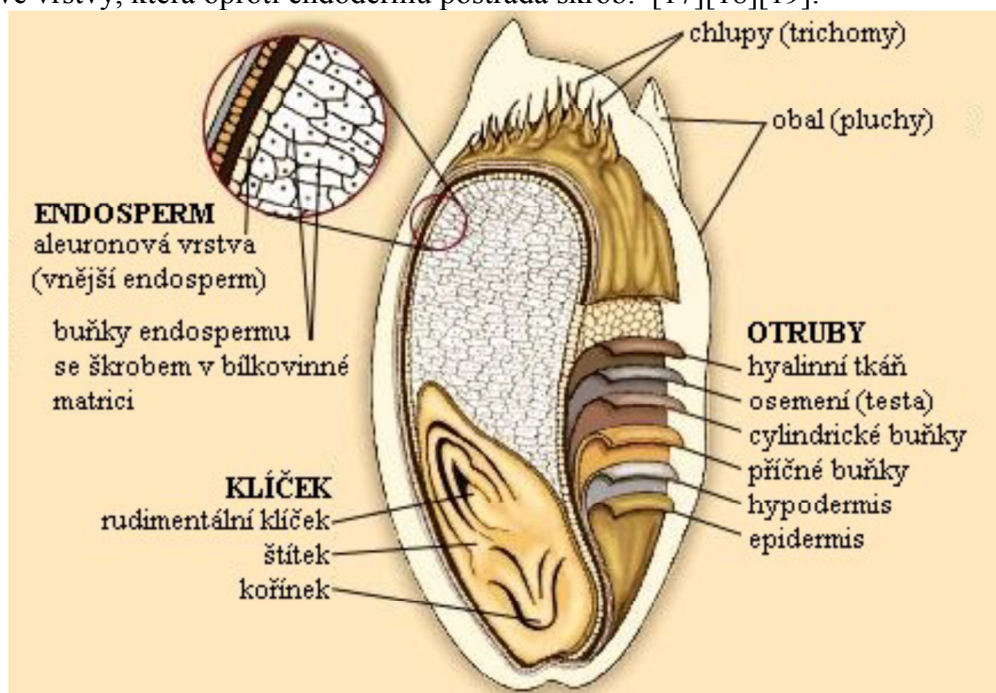
Morfologická skladba zrna je u všech obilovin téměř stejná. Odlišnosti jsou ve tvaru, velikosti a v podílu jednotlivých vrstev. Rozměry zrna ovlivňuje mnoho faktorů. Mohou se lišit i pro stejný druh v závislosti na odrůdě, klimatických podmínkách, lokalitách, kvalitě půdy a případném hnojení. Obilka může buď obsahovat pluchy, nebo může být nahá. Pluchatá obilka obsahuje pluchu a plušku, které těsně přiléhají k obilce nebo s ní srůstají. Zrna se před zpracováním musí oloupat a obrušovat, aby došlo k odstranění pluch spolu s klíčky. Mezi pluchaté obiloviny patří ječmen, oves, rýže, čirok nebo třeba proso. Nahá obilka nemá pluchy, takže při mlácení vypadává samotná obilka z obalů. Mezi nahé obilky patří pšenice, žito a kukuřice [14][17].

Každá obilka se skládá ze tří hlavních částí – obalové vrstvy, klíčku a endospermu. Morfologie pšeničného zrna je zobrazena na obrázku 5. Nejsvrchnější obalové vrstvy se nazývají oplodí. Jsou tvořené nerozpustnými a obtížně bobtnajícími materiály, převážně celulózou, dodávajícími mechanickou pevnost. Tvoří tak pro zrna ochrannou vrstvu před mechanickým poškozením, škodlivými látkami a krátkodobými účinky vody. Obalové vrstvy obsahují také velké množství vlákniny, minerály a fenolické sloučeniny. Obalové vrstvy se označují též jako otruby. Často slouží jako zdroj nestravitelné vlákniny. Zhoršují kvalitu a vzhled pekařských výrobků. Pod oplodím se nachází osemení, které ve svých

buňkách obsahuje barviva určující výsledný barevný vzhled zrna. Podpovrchové vrstvy jsou také složeny z polysacharidů, které velmi pevně váží vodu – pentosanů a β -glukanů. [17][18].

Mezi obalovými vrstvami a endospermem se nachází aleuronová vrstva, někdy označovaná jako vnější endosperm. Jedná se o vrstvu velkých buněk s vysokým podílem bílkovin a nejvyšším obsahem minerálních látek. Proteiny a enzymy této vrstvy hrají důležitou roli při klíčení. Podle způsobu a podmínek mletí tato vrstva buď zůstává ulpělá na otrubách, nebo přechází do mouky, čímž se zvyšuje obsah bílkovin a minerálů (popela) v mouce. Tato vrstva obsahuje také fytochemické látky a je bohatá na vitamin B [17][19].

Uvnitř zrna se nachází klíček a endosperm. Klíček (embryo) je zárodkem nové rostliny. Je bohatý na minerály, bílkoviny, lipidy a vitaminy niacin, thiamin a kyselinu listovou. Před mletím se odstraňuje tzv. broušením a špicováním, protože podléhá rychle oxidačním a enzymatickým změnám, takže by došlo k podstatnému sensorickému zhoršení kvality výrobku nebo mouky. Endosperm tvoří největší část zrna. Jedná se o technologicky nejvýznamnější část. Je hlavním zdrojem zásobních látek v době klíčení. Nachází se v něm 75 % škrobu, 10–13 % proteinů, 1,5 % lipidů a malé množství minerálních látek a nerozpustné vlákniny. Mouka představuje téměř čistý rozdrcený endosperm. Proteiny obsažené v endodermu se nazývají lepkotvorné. Vnitřní endosperm obsahuje jen malé množství minerálních látek, vitamínů a fytochemických látek, které jsou hlavní složkou aleuronové vrstvy, která oproti endodermu postrádá škrob. [17][18][19].



Obrázek 5: Morfologie pšeničného zrna. Převzato a upraveno podle [20].

2.6 Pšeničné proteiny

Z výživového hlediska je pro člověka nejdůležitější částí rostliny pšeničné zrna. Jak bylo popsáno v odstavci 2.5, zrna se skládá ze tří hlavních částí, kde největší obsah bílkovin má endosperm. Endosperm tvoří 80–85 % celkové hmotnosti obilky. Tři čtvrtiny jeho hmotnosti tvoří škrob. Molekulová hmotnost pšeničných proteinů se pohybuje v rozmezí od 30 000

až do více než 10 milionů [21]. Pšeničné proteiny se výrazně liší od ostatních rostlinných proteinů. Kvalita mouky a nutriční hodnota zrna silně závisí na složení a množství pšeničných proteinů, které se liší podle odrůdy pšenice, nebo třeba podle podmínek růstu rostliny [22]. Podle Bénétrix [23] se ve zralém pšeničném zrně nachází 10 až 15 % proteinů, podle Wrigley [24] 10 – 13 %, DuPont [25] uvádí množství stejně jako Žilić [26] v rozmezí 8 až 20 %. Proteiny obsažené v pšeničném zrně jsou značně složité a vzájemně spolu interagují, čímž je zkomplikována jejich charakterizace. Mnohé tyto proteiny působí zároveň jako enzymy zapojené v metabolických drahách [26].

Jednotlivé obiloviny se příliš neliší v zastoupení jednotlivých základních aminokyselin. Z tabulky 1 můžeme vidět, že nejvíce zastoupená aminokyselina v pšeničném zrně je glutamin. Jeho obsah činí zhruba 30 % z celkového obsahu aminokyselin. Druhou nejvíce zastoupenou aminokyselinou je prolin. Naopak vůbec se v zrně nevyskytují aminokyseliny kyselina asparagová a kyselina glutamová [27].

Tabulka 1: Obsah aminokyselin v zrně pšenice (vztaženo na 16 g dusíku) [27]

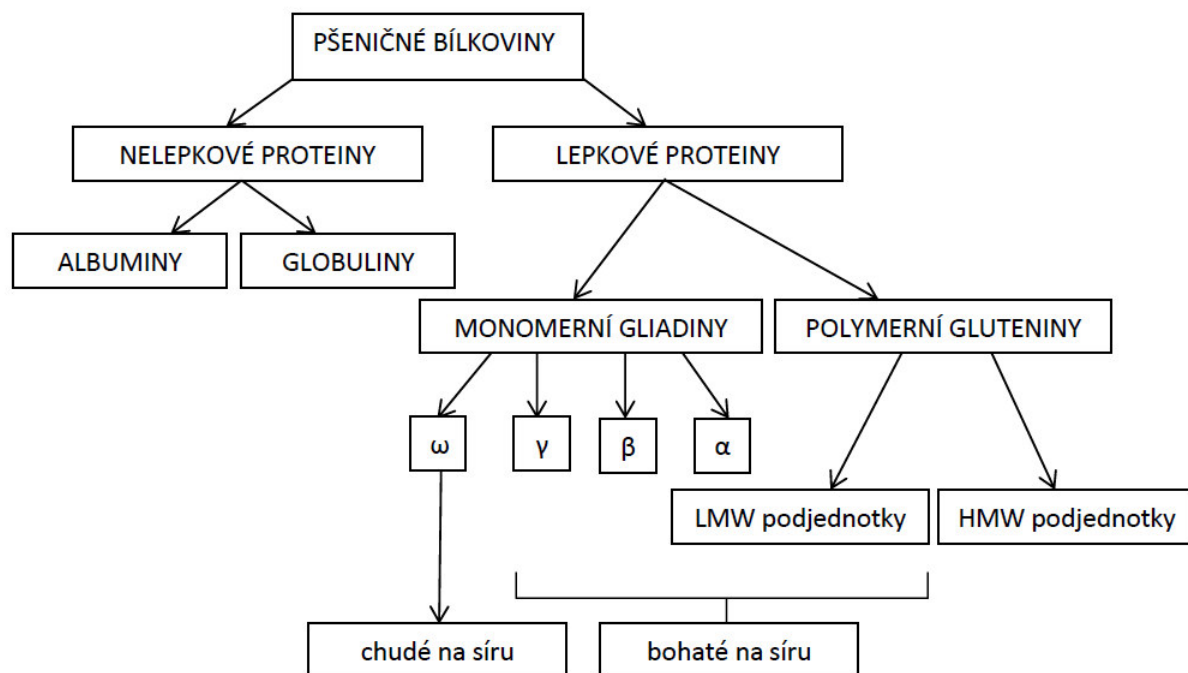
aminokyselina	obsah [g]	aminokyselina	obsah [g]
Glycin (Gly)	3,9	Kys. glutamová (Glu)	0
Alanin (Ala)	3,6	Asparagin (Asn)	4,9
Valin (Val)	4,4	Glutamin (Gln)	29,9
Leucin (Leu)	6,7	Lysin (Lys)	2,9
Isoleucin (Ile)	3,3	Arginin (Arg)	4,6
Serin (Ser)	4,6	Histidin (His)	2,3
Threonin (Thr)	2,9	Gfenylalanin (Phe)	4,5
Cystein (Cys)	2,5	Tyrosin (Tyr)	3
Methionin (Met)	1,5	Tryptofan (Trp)	0,9
Kys. asparagová (Asp)	0	Prolin (Pro)	9,9

Proteiny pšeničného zrna lze klasifikovat podle jejich rozpustnosti. V roce 1924 je T. B. Osborne [28] rozdělil podle rozpustnosti do pěti frakcí: (1) albuminy rozpustné ve vodě, (2) globuliny rozpustné ve zředěných roztocích solí, (3) gliadiny rozpustné ve vodném roztoku ethanolu (70%), (4) gluteniny nerozpustné v ethanolu, ale z části rozpustné ve zředěných roztocích kyselin nebo zásad a (5) nerozpustný zbytek. Nerozpustným zbytkem se rozumí amfifilní proteiny vázané na lipidy a tvořící složku buněčných membrán a hydrofobních vrstev [29]. Tato frakcionace je sice zřídka přesná, ale vzhledem k její relativní jednoduchosti se využívá jako první separační krok ve studiích týkajících se proteinového složení [28].

Z funkčního hlediska rozlišujeme dvě základní skupiny. První skupinu tvoří albuminy a globuliny (15–20 % celkového obsahu proteinů v zrně), vyskytující se převážně ve vnějších vrstvách zrna a jen minimálně v endospermu. Mají převážně metabolickou funkci. Druhou skupinu tvoří lepkové proteiny (80–85 % celkového obsahu proteinů v zrně), které jsou významné v pekařství. Nachází se ve zralém pšeničném zrně v aleuronové vrstvě. Řadí se mezi ně monomerní gliadiny a polymerní gluteniny. Jejich poměr bývá 2:3. Mají výhradně zásobní funkci [30].

Podle strukturních a funkčních vlastností dělíme prolaminy (lepkové proteiny) do tří skupin: (a) prolaminy chudé na síru (ω -gliadiny), (b) prolaminy bohaté na síru (α, β, γ -gliadiny

a LMW gluteniny) a (c) vysokomolekulární gluteniny (HMW) [31]. Celkový přehled rozdělení pšeničných proteinů je zobrazeno na obrázku Obrázek 6.



Obrázek 6: Základní rozdělení pšeničných proteinů. Převzato a doplněno podle [32] .

2.6.1 Albuminy a globuliny

Albuminy a globuliny jsou označovány jako rozpustné nelepkové pšeničné proteiny. Albuminy jsou proteiny rozpustné ve vodě a zředěných pufrách, globuliny ve zředěných roztocích solí, jak bylo uvedeno v odstavci 2.6 [28]. Albuminy a globuliny zaujímají 15–20 % celkového obsahu proteinů v zrne. Vyskytují se převážně ve vnějších vrstvách zrna a jen minimálně v endospermu. Jejich funkce je převážně metabolická a strukturní [30]. Jsou součástí enzymů (α - a β -amylasy, proteasy, lipasy, fytasy, lipoxxygenasy aj. [17]) a jejich inhibitorů regulujících vývoj rostliny, jako součást buněčných stěn a membrán [33].

Albuminy chrání rostlinu před hmyzem a patogeny, vysokomolekulární albuminy a globuliny slouží jako zásobárna živin pro klíčící embryo [34]. Nejznámější a nejlépe prostudovaný pšeničný albumin je leukosin [27]. Molekulová hmotnost obou typů proteinů (albuminů i globulinů) je většinou nižší než 25 kDa [34]. Polymerní globuliny, tzv. triticiny, se skládají z velkých (40 kDa) a malých (22–23 kDa) polypeptidových řetězců. Primárně tvoří dimerní struktury [35]. Albuminy i globuliny mají vliv na zpracování a reologické vlastnosti mouky. Z nutričního hlediska jsou považovány tyto proteiny za lepší, jelikož co do aminokyselinového složení obsahují více lysinu a methioninu, než lepkové proteiny [34]. Bývají původci různých alergií, astmatu, průjmů a zvracení [36].

2.6.2 Lepkové proteiny

Pšeničný lepek byl poprvé vyizolován v roce 1754 J. B. Beccarim v Bologni [26]. Skládá se z 80 až 85 % bílkovin, 5 % lipidů, 7–16 % sacharidů a zbytek tvoří minerály. Lepkové proteiny se klasifikují do dvou skupin a to jsou v alkoholu rozpustné gliadiny a v alkoholu nerozpustné gluteniny. [34].

Lepkové proteiny tvoří 80–85 % celkového obsahu proteinů v znu. Řadí se mezi ně monomerní gliadiny a polymerní gluteniny. Jejich poměr bývá 2:3 [30]. Bývají bohaté na asparagin, glutamin, arginin nebo prolin. Naproti tomu obsahují velmi nízké množství nutričně důležitých aminokyselin jako je lysin, tryptofan a methionin [26]. Cystein hraje velmi důležitou roli pro vytváření správné struktury a funkčnosti lepku prostřednictvím hydrofobních interakcí a vodíkových vazeb. Tvoří však jen asi 2 % celkových aminokyselin [34]. Většina cysteinu se vyskytuje v oxidovaném stavu a tvoří disulfidické můstky uvnitř proteinů nebo mezi proteiny, čímž dochází k tvorbě řetězců. Disulfidické můstky jsou hlavními reakčními místy ve většině redoxních reakcí, které probíhají během zrání zrna, mletí, přípravě těsta a pečení [37].

Lepkové proteiny mají výhradně zásobní funkci. Slouží jako zdroj dusíku během klíčení zrna [30]. Z technologického hlediska lepek zajišťuje elasticitu a roztážnost těsta, jeho soudržnost a schopnost zadržovat vodu. Elasticita (gliadiny) a pružnost (gluteniny) jsou klíčové a díky nim je pšenice považována za nejlepší materiál nejen pro pekařství, ale i na výrobu těstovin a dalších druhů potravin [34].

Lepkové bílkoviny jsou častými původci potravinových alergií a intolerancí jako třeba celiakie, která je podrobněji rozebrána v odstavci 2.7 [38].

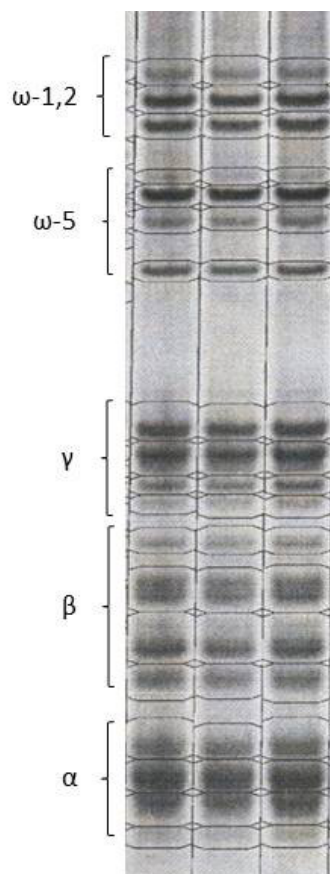
Lepek lze z těsta izolovat vypíráním roztokem chloridu sodného (20 g/l). Postupně se vyplavují látky rozpustné ve vodě a škrobová zrna. Zůstává pouze tzv. mokrá lepek. Ten obsahuje po vymačkání nebo odstředění vody 90 % bílkovin, 8% lipidů a 2 % sacharidů [17].

2.6.2.1 Gliadiny

Gliadiny se nachází převážně v aleuronové vrstvě zrna (obrázek 5). Jejich zásobní funkce je zajištěna převážně díky vysokému obsahu prolinu a glutaminu. Vyskytují se jako monomery. Skládají se z jednoho polypeptidového řetězce. Intramolekulární disulfidické můstky vedou k tvorbě globulárních struktur gliadinů. Jsou bohaté na prolin a glutamin. Gliadiny zaujímají 30–40 % z celkových pšeničných bílkovin. Jsou to polymerní směsi nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v kyselinách, zásadách a 70% ethanolu. Hydratované gliadiny mají malou elasticitu a jsou méně soudržné než gluteniny. Přispívají spíše k viskozitě a roztážnosti těsta [34].

Většinou se dělí podle elektroforetické mobility v polyakrylamidovém gelu v kyselém pH do pěti skupin na ω -5-, ω -1,2-, α -, β - a γ -gliadiny, jak lze vidět na obrázku 7. Nejvyšší mobilitu mají α -gliadiny, následují β -, γ -, ω -5 a ω -1,2-gliadiny. Další způsob dělení gliadinů je podle molekulárních hmotností a aminokyselinového složení. Molekulová hmotnost gliadinů je od 30 do 80 kDa a podle toho se dělí na α - a β -gliadiny, které mají podobné vlastnosti, s γ -gliadiny pak mají i podobnou hmotnost v rozmezí od 28 kDa do 35 kDa. ω -5-

gliadiny mají molekulovou hmotnost okolo 49–55 kDa a ω -1,2-gliadiny asi 39–44 kDa. ω -gliadiny jsou největší a zároveň nejméně zastoupené frakce [34][37].



Obrázek 7: Rozdělení gliadinových proteinů pomocí A-PAGE

Co se týče aminokyselinového složení jednotlivých frakcí gliadinových bílkovin, je ukázáno v tabulce 2. ω -gliadiny obsahují nejvíce glutaminu, prolinu a fenylalaninu, ale prakticky neobsahují cystein, takže nemohou tvořit disulfidické vazby. α/β - a γ -gliadiny obsahují naopak více tyrosinu a glycinu. Díky přítomnosti cysteinu mohou tvořit disulfidické můstky [39]. Nerozpustnost ve vodě je způsobena nízkým obsahem polárních aminokyselin [40].

Tabulka 2: Charakteristika gliadinových proteinů podle [37].

Frakce gliadinových proteinů	Zastoupení mezi celkovými lepkovými proteiny (%)	Zastoupení nejčastějších aminokyselin (%)				
		Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
ω -5-gliadiny	3-6	56	20	9	1	1
ω -1,2-gliadiny	4-7	44	26	8	1	1
α/β -gliadiny	28-33	37	16	4	3	2
γ -gliadiny	23-31	35	17	5	1	3

Největší podíl na složení lepku mají α - a γ -gliadiny a nízkomolekulární gluteniny. Každá skupina tvoří asi 20–30% lepku. Menší část lepku je tvořena gliadiny ω -5-, ω -1,2- a vysokomolekulárními gluteniny. Každá skupina tvoří asi 2–10% lepku [41]. Celková distribuce jednotlivých skupin gliadinů je závislá na kultivaru pšenice a na podmínkách kultivace, jako jsou například půda, klima nebo hnojení [42].

2.6.2.2 Gluteniny

Gluteniny jsou polymerní bílkoviny pšeničného lepku spojené disulfidickými vazbami. Mají schopnost tvořit největší a nekomplexnější proteinové polymery v přírodě. Jsou nerozpustné v alkoholu na rozdíl od gliadinů [34]. Rozpouští se ve zředěných roztocích solí, kyselin a zásad [27]. Mají podobné aminokyselinové složení jako gliadiny, jak je možné vidět v tabulce 3. Obsahují hodně glutaminu a prolinu a málo nabitých aminokyselin [34].

Tabulka 3: Charakteristika gluteninových proteinů podle [37].

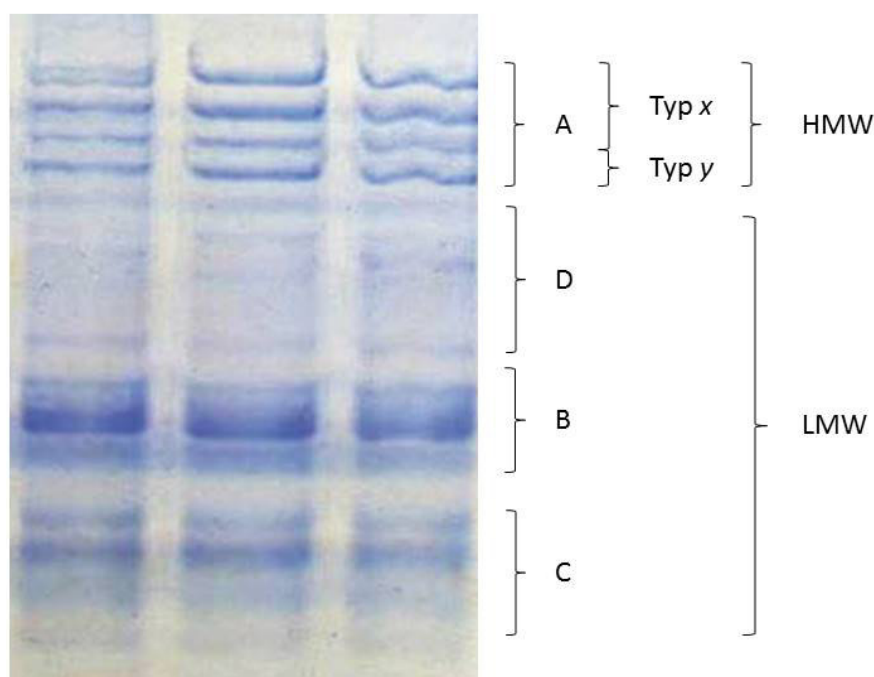
Frakce gluteninových proteinů	Zastoupení mezi celkovými lepkovými proteiny (%)	Zastoupení nejčastějších aminokyselin (%)				
		Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
<i>x</i> -HMW-gluteninové podjednotky	4-9	37	13	0	6	19
<i>y</i> -HMW-gluteninové podjednotky	3-4	36	11	0	5	18
LMW-gluteninové podjednotky	19-25	38	13	4	1	3

Gluteniny se dělí na vysokomolekulární (HMW) s molekulovou hmotností v rozmezí mezi 65 a 90 kDa a nízkomolekulární (LMW) s molekulovou hmotností v rozmezí mezi 32 a 39 kDa [37]. HMW gluteninové podjednotky se akumulují převážně v pozdějším stádiu vývoje zrna, takže na ně budou mít globální změny klimatu větší vliv než na LMW podjednotky, které se syntetizují v raném stádiu vývoje zrna [43]. HMW podjednotky se dělí podle počtu cysteinových zbytků v N-koncové části řetězce na *x*-HMW s molekulovou hmotností 83–88 kDa a *y*-HMW s molekulovou hmotností 67–74 kDa [40]. *x*-HMW podjednotky ve své struktuře obsahují čtyři cysteiny, kdy dva se podílí na intramolekulárních vazbách a dva na meziřetězcových vazbách. *y*-HMW podjednotky obsahují sedm cysteinů, známé jsou však meziřetězcové vazby pouze u tří z nich. Dva cysteiny propojují paralelně podjednotku s druhou *y*-HMW podjednotkou a jeden zprostředkovává vazbu s LMW podjednotkou [34][37].

Dále se gluteniny dělí podle své elektroforetické mobility (po vyloučení gliadinových frakcí) na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS–PAGE) na A, B, C a D podskupiny, jak ukazuje obrázek 8. Podskupina A (molekulová hmotnost 80–120 kDa) je považována za vysokomolekulární, B, C a D (vysoce kyselé) jsou označovány jako nízkomolekulární a liší se svojí molekulovou hmotností. Podskupina B má molekulovou hmotnost 42–51 kDa, podskupina C 30–74 kDa a podskupina D 52–74 kDa. LMW podjednotky B, C a D obsahují methionin jako první aminokyselinu sekvence. B a C

podskupina se podobá α/β - a γ -gliadinům a tvoří asi 60% nízkomolekulárních gluteninů. Podskupina D se podobá ω -gliadinům [34][44].

Vysokomolekulární gluteniny (HMW) představují 5–10% celkového množství pšeničných bílkovin, jak ukazuje tabulka 3. Především α -HMW podjednotky mají klíčový vliv na viskoelastické vlastnosti lepků a pšeničného těsta. Stejně tak je zřejmé z tabulky 3, že hlavní složku gluteninů tvoří z 19–25 % nízkomolekulární podjednotky (LMW) [34]. Nízkomolekulární podjednotky mají ve své struktuře osm cysteinových zbytků. Šest z nich tvoří intramolekulární disulfidické vazby uvnitř LMW, zbylé dva cysteiny tvoří intermolekulární disulfidické vazby s jinými proteiny lepkového komplexu [37]. Extrakce gluteninů z pšeničné mouky v neporušené podobě je prakticky nemožná. Stejně tak je obtížné odhadnout skutečné množství a velikost gluteninového polymeru. Gluteniny jsou odpovědné za pružnost lepků, pevnost těsta a mají velký vliv na výsledný objem pekařských výrobků [34].



Obrázek 8: SDS-PAGE gluteninových podjednotek. Převzato a upraveno podle [45].

2.7 Nemoci spojené s lepkem

Lepek patří mezi nepřeberné množství alergenů, které mohou způsobit potravinovou alergii u člověka. Je pozorován výrazný nárůst reakcí na potraviny v celosvětovém měřítku, převážně pak v posledních desetiletích. Příčin vzniku je hned několik, mezi nejčastější patří změna životního stylu, zvýšení hygienické péče, zdroj pitné vody, vliv farmakoterapie, očkování a změny stravovacích návyků. Potravinová alergie je reakce, která je prokazatelně způsobena poruchou imunitního systému jedince. Potravina může obsahovat celé množství alergenů, které mohou vyvolat imunitní reakci. Patří mezi ně i přídatné látky, které se běžně používají v potravinářském průmyslu, jako jsou konzervanty, antioxidanty, barviva a chuťová korigencia. Alergickou reakci na potraviny vyvolávají nejčastěji proteiny, nebo polysacharidy v potravinách. Alergeny mají také různou termostabilitu, takže určitý druh např. ovoce nebo zeleniny může vyvolat alergickou reakci v syrovém stavu, ale po tepelné úpravě

už k alergické reakci nedojde. Rizikovou skupinou alergiků pro vznik potravinové alergie jsou lidé s atopickou dermatitidou a pylovou alergií. Cílovou tkání alergické reakce může být prakticky kterýkoliv orgán. Jedinou příčinnou léčbou je dlouhodobá naprostá eliminace vyvolávající potraviny z jídelníčku pacienta. Preventivní podávání léků proti alergiím se prokázalo jako neúčinné [46][47].

Lepek obsahuje ze všech rostlinných bílkovin nejvyšší koncentraci glutaminu a prolinu. Obsah lepku je nejvyšší v pšenici, následují žito, ječmen a oves. Jak gliadiny, tak gluteniny obsahují peptidy, které mají takové aminokyselinové sekvence, které považuje imunitní systém u alergických jedinců za cizorodé, a proto na ně reaguje imunitní reakcí. Reakce imunitního systému jsou různé a podle toho se liší choroby, které lepek způsobuje. Alergie na lepek a celiakie jsou způsobeny systémem adaptivní (specifické, získané) imunity s aktivací T buněk ve střevní sliznici. Poruchy mechanismů vrozené (nespecifické) imunity jsou považovány za příčinu citlivosti na lepek [48].

2.7.1 Alergie na lepek

O alergii na lepek se mluví převážně v souvislosti s pšenicí, která obsahuje největší množství glutaminu a prolinu. Je způsobena tvorbou protilátek typu IgE (imunoglobuliny E), které reagují se sekvencemi glutaminu a prolinu při štěpení lepku. Příznaky se projevují krátce po konzumaci potraviny obsahující lepek, řádově během minut po setkání s antigenem. Projevy alergie se liší. Mezi hlavní formy patří potravinová alergie, profesionální astma pekařů a rinitida [48].

Anafylaxe je nejzávažnější forma potravinové alergie, která je vyvolaná fyzickou aktivitou. Způsobují ji ω -gliadiny. Základní diagnostickou metodou jsou kožní testy. Astma pekařů a rinitida vznikají po vdechování mouky a obilných prachů. Diagnostika je opět založena na kožních testech. Oproti celiakii se nejedná o doživotní onemocnění, ale může dojít k samovolnému odeznění alergie. Jedinou doposud známou a funkční léčbou je bezlepková dieta [48].

2.7.2 Celiakie

Celiakie je typická dědičná autoimunitní reakce organismu, která se vyskytuje u dětí i dospělých ve všech zemích světa. Jedná se o celoživotní chronické onemocnění, které je charakteristické trvalou nesnášenlivostí lepku (především gliadinů) a typickými zánětlivými změnami sliznice tenkého střeva. Díky tomu dochází k poruše vstřebávání všech hlavních živin, minerálních látek a vitamínů. Problémy se projevují v horizontu několika hodin až dní po požití potraviny obsahující lepek. Jde o velice častou chorobu. V Evropě se počet celiaků odhaduje na 3 miliony, z toho v České republice se počet předpokládá na 40 000–50 000 celiaků. Častějšími pacienty bývají ženy než muži, v poměru 2:1 [48][49].

Celiakie je multifaktoriální choroba, kdy dochází k interakci různých genetických vlivů a vlivů prostředí. Uplatňuje se jak genetická dispozice, tak kojení a výživa dítěte v prvním roce života. Pro vznik celiakie je rozhodující zvýšený paracelulární transport makromolekul přes těsná spojení, která spolu s enterocyty vytvářejí slizniční bariéru tenkého střeva. Těsná

spojení představují složitou strukturu více než 50 bílkovin, z nichž nejdůležitější je zonulin. Zonulin má rozhodující úlohu v regulaci permeability těsných spojení [48].

Projevy se liší podle věku nemocného. Typické střevní příznaky se vyskytují převážně u malých dětí v podobě průjmů, břišních kolik, může dojít k zástavě růstu, náladovosti a deficitu svalové hmoty. Děti předškolního věku častěji trpí chudokrevností a opožděným psychosomatickým vývojem. V pubertě může dojít k ústupu nemoci a v dospělosti dochází k opětovnému probuzení nemoci. Jedinou doposud známou a funkční léčbou je bezlepková dieta [48].

Rozeznáváme pět forem celiakie (tabulka 4). Liší se od sebe anamnézou, příznaky a nálezem ve střevní biopsii. Nejčastějším příznakem je pozitivita autoprotilátek k tkáňové transglutamináze (AtTGA) a k endomyziu (AEA). Co se týče střevní biopsie, změny histologie začínají od přítomnosti zvýšeného počtu intraepiteliálních lymfocytů přes změny vzhledu krypt po různý stupeň atrofie až vymizení klků. U klasické celiakie převládají gastrointestinální příznaky, jako jsou chronický průjem, nadýmání, váhový úbytek, úbytek svalové hmoty, otoky, anémie, hypalbuminemie, hypokalcemie a deficit vitaminů. U atypické celiakie jsou pouze minimální nebo úplně chybí gastrointestinální příznaky. Převažují mimostřevní projevy, jako je deficit železa až anémie, osteoporóza, infertilita, u dětí zpomalený růst. Silentní forma se vyskytuje u pacientů, kteří jsou tzv. klinicky němí. Nemají ani gastrointestinální příznaky ani anémii nebo osteoporózu. Častá je pozitivní rodinná anamnéza. Latentní celiakie je charakterizována normální histologií nebo zvýšeným počtem intraepiteliálních lymfocytů. Jedná se o skupinu lidí, kteří dobře snášejí bezlepkovou dietu, anebo o skupinu lidí, u kterých k rozvoji choroby teprve může dojít. Potenciální celiaci jsou pozitivní na přítomnost protilátek, avšak histologická struktura a sérologie je v normálu [49][50].

Tabulka 4:Formy celiakie [49].

Forma	Protilátky	Biopsie	Příznaky
Klasická	+	+	+
Atypická	+	+	atypické (mimostřevní)
Silentní	+	+	0, často RA (+)
Latentní	+	↑ IEL	0
Potenciální	+ nebo 0	↑ IEL nebo 0	většinou 0
+ pozitivní, 0 negativní, ↑ zvýšení, RA rodinná anamnéza, IEL intraepiteliální lymfocyty			

Celiakii doprovází řada jiných autoimunitních chorob. U celiaků je výskyt těchto onemocnění až třicetkrát častější než v běžné populaci. Velice často se sdružuje celiakie s diabetem 1. typu (3–8 %). Mezi další přidružené choroby patří autoimunitní hepatitida, první biliární cirhóza, choroby pojiva, juvenilní revmatoidní artritida, intersticiální plicní fibróza, Downův nebo Turnerův syndrom a řada dalších onemocnění. Kromě výskytu přidruženého onemocnění může dojít také k řadě dalších komplikací, kdy organismus nebude reagovat na léčbu (refrakterní celiakie), existuje vyšší riziko výskytu maligních nádorů, může docházet k neuropsychiatrickým komplikacím a řadě dalších [49][50].

2.7.3 Neceliacká citlivost na lepek

Neceliacká citlivost na lepek je způsobena poruchami mechanismů vrozené (nespecifické) imunity. Jedinci trpící tímto onemocněním sice mají obtíže při konzumaci potravin obsahujících lepek a zlepšují se při bezlepkové dietě, je však nemožné u nich identifikovat alergické nebo autoimunitní mechanismy způsobené lepkem. Symptomy jsou kombinací jak celiakie, tak alergie na lepek. Potíže se mohou projevovat průjmem, bolestí břicha, ekzémem, anémií, bolestí hlavy, depresemi, poruchami chování, chronickou únavou, poklesem tělesné hmotnosti, bolestí kostí a kloubů. Nemocní nemají na rozdíl od celiaků selektivní deficit celkového IgA. Citlivost na lepek není doprovázen žádnými autoimunitními chorobami [48].

2.8 Pšeničné proteiny a kvalita těsta

2.8.1 Tvorba těsta

Lepkové proteiny pšenice, tedy gliadiny a gluteniny, jen omezeně bobtnají v přítomnosti vody. Když však dodáme mechanickou energii, vzniká lepek v podobě pevného gelu, který je základní složkou těsta. Při tvorbě jeho správné 3D struktury jsou velice důležité vazby, které se tvoří mezi bílkovinami. K nejpodstatnějším patří vodíkové můstky. Mezi kyselými a bazickými skupinami aminokyselin dochází k tvorbě iontové vazby [17]. Interakcí nepolárních skupin aminokyselin dochází ke vzniku vazeb hydrofobních. Jejich efekt není až tak markantní [24]. Ve vodném prostředí se tvoří také vazby hydrofilní [17]. Nejpevnějšími vazbami jsou vazby disulfidické, které navzájem spojují monomerní bílkovinné řetězce a tvoří z nich řetězce polymerní [24].

2.8.2 Kvalita těsta

Kvalita rostlinných produktů záleží nejen na druhu a odrůdě rostliny, ale také na působení vnějších podmínek během vegetace, sklizně a skladování. Kvalita pšenice a tedy i kvalita těsta se posuzuje podle toho, jak je vhodná pro vytvoření požadovaného konečného produktu. Konečným produktem může být jakýkoliv druh pečiva, cereální výrobky, sušenky, dezerty a řada dalších. Definovat pojem „kvalita pšenice“ je velmi těžké. Pro pekařství je nejlepší pšenice s vysokou hodnotou objemové hmotnosti, pro tvorbu těstovin je však nevhodná [24].

Z kvalitativních vlastností mouky jsou nejdůležitější obsah a složení proteinů, které mají vliv na viskoelastické vlastnosti těsta [34]. Jestliže je ve vzorku pšenice podobné množství lepkových proteinů, je tedy zachován poměr gliadinů a gluteninů, může docházet k velkým změnám pevnosti a extensibility těsta vlivem změny poměru HMW a LMW gluteninů. Jestliže se poměr sníží, pevnost těsta klesá, naopak extensibilita roste. V opačném případě, když poměr vzroste, vzroste i pevnost těsta a objemová hmotnost [24]. N. Fernando a kol. [51] zkoumali vliv zvýšené koncentrace CO₂ (550 μmol·mol⁻¹) na vlastnosti těsta. Zjistili, že stabilita a roztažnost těsta zůstává stejná, snižuje se však pevnost těsta a objemová hmotnost. Celkový obsah pšeničných proteinů byl nižší, než při pěstování pšenice v běžných podmínkách, při normální koncentraci CO₂ (410 μmol·mol⁻¹). Snížilo se hlavně množství HMW gluteninů, množství LMW gluteninů se nezměnilo. To je způsobeno odlišnou dobou syntézy v rostlině. HMW gluteninové podjednotky se akumulují převážně v pozdějším stadiu

vývoje zrna, takže na ně budou mít globální změny klimatu větší vliv než na LMW podjednotky, které se syntetizují v raném stádiu vývoje zrna [43].

Kromě obsahu lepkových proteinů v mouce, je asi nejdůležitější charakteristikou lepku distribuce velikosti (molekulové hmotnosti) proteinů lepku. Od té se odvíjí doba míchání těsta. Distribuce velikosti proteinů je důležitá hlavně u polymerních molekul, které jsou tvořené pomocí disulfidických můstků. Působením redukčních činidel dochází ke štěpení těchto vazeb a dochází ke ztrátě pevnosti těsta. V případě působení oxidačních činidel dochází k posílení tvorby intermolekulárních disulfidických vazeb a těsto je tedy pevnější. Nejvhodnějším redukčním činidlem je dithiotreitol, za nejvhodnější oxidační činidlo se pokládá bromičnan, jelikož vlivem těchto činidel nedochází k porušení struktury gliadinů, které obsahují ve svojí struktuře pouze intramolekulární disulfidické vazby [24].

2.9 Vliv globálních klimatických změn na pšenici

Vliv globálních klimatických změn na různé druhy hospodářských plodin zkoumalo mnoho autorů, např. Stefani Daryanto a kol. [52] sledovali vliv globálních klimatických změn na různé druhy rostlin: obiloviny, luštěniny, hlíznaté a kořenové plodiny. Zjistili, že obiloviny měly nejmenší snížení výnosů vlivem sucha ve srovnání s ostatními jmenovanými rostlinami a jsou tedy vůči suchu odolnější. K většímu snížení výnosů došlo, jestliže bylo sucho během reprodukčního vývoje rostlin, kdy docházelo u obilovin k plnění zrn a u hlíznatých plodin k hromadění hlíz. Pšenice projevuje citlivost vůči suchu i během vegetační fáze. Menší vliv sucha na výtěžek obilovin je způsoben také přítomností rozsáhlého a hlubokého kořenového systému. Byla pozorována variabilita výtěžků různých druhů obilovin, která by mohla být způsobena rozdíly ve fyziologických vlastnostech rostlin, protože různé druhy obilovin disponují různými adaptačními mechanismy k suchu. Rozdíly byly sledovány i v rámci jednoho rodu, např. pšenice tvrdá (*Triticum durum*) je citlivější na sucho než pšenice setá (*Triticum aestivum*). To může být způsobeno dlouhou domestikací a hybridizací pšenice, čímž byla způsobena široká rozmanitost genomu mezi divokými a domestikovanými druhy. Výtěžnost pšenice závisí také na množství přítomné vody. Mírné sucho (snížení množství vody o 40 %) ovlivňuje pouze hmotnost zrna, zatímco vážný deficit vody (snížení množství vody o více než 50 %) způsobuje pokles počtu úrodných klasů na plochu, a také pokles počtu zrn v jednom klasu.

Balla a kol. [22] zjistili, že vysoká teplota a sucho má daleko větší vliv na výtěžek pšenice než samotný teplotní stres. Porovnávali faktory zvláště i při společném působení a došli k následujícím závěrům. Jestliže byla rostlina vystavena stresu suchem, došlo ke snížení výnosů o 57 %, jestliže byla rostlina vystavena vysoké teplotě (35 °C), došlo k poklesu výnosů pouze o 31 % a jestliže byla rostlina stresována jak suchem, tak teplem, vliv byl velmi nepříznivý a došlo k poklesu výnosu až o 76 %. S vysokou teplotou a suchem nebo jen suchem se pojí také horší kvalita zrna, zatímco při vysoké teplotě je kvalita zrna beze změny nebo lepší díky lepšímu poměru jednotlivých bílkovinných frakcí.

2.9.1 Vliv na škrob v zrně

V mnoha literárních zdrojích dochází autoři ke stejnému závěru, že při stresových podmínkách působících na rostlinu během jejího vývoje dochází ke zvýšení množství bílkovin v zrně a zároveň dochází ke snížení výtěžků. Podle García del Moral a kol. [53] dochází ke zvýšení obsahu bílkovin v zrně o 22,7 %, podle Fana a kol. [54] dochází ke zvýšení obsahu gliadinových frakcí. Yang a kol. [55] zjistili, že vlivem různých stresorů dochází k zvýšení obsahu gluteninových frakcí během plnění zrna. Ve zralosti byl prokázán zvýšený obsah jak gluteninů, tak gliadinů. To je však v rozporu s jinými nálezy [22][55][56], kdy při vysoké teplotě by se v pšenici měla indukovat syntéza gliadinů na úkor gluteninů. Jestliže na rostlinu působí současně více stresorů, jako třeba vysoká teplota a deficit vody, dochází k výraznému nárůstu obsahu gluteninů oproti stavu, kdy se na rostlinu působí jediným stresorem. Balla a kol. [22] vysvětlují snížení výtěžků vlivem stresových podmínek snížením produkce škrobu. Labuschagne a kol. [56] uvádí, že vlivem působení vysoké teploty (32 °C) dochází k významnému snížení obsahu škrobu v zrně, jelikož dochází k inaktivaci škrobové syntázy, a zároveň dochází k poklesu hmotnosti a průměru těchto zrn. Zvyšuje se obsah amylosy, zvyšuje se poměr amylosy a amylopektinu. Vlivem vysokých teplot následně dochází ke gelování amylosy.

2.9.2 Vliv na bílkoviny v zrně

Skladba pšeničných bílkovin je rozhodujícím faktorem kvality těsta a následných konečných produktů. Je ovlivněna různými druhy stresu. Lepkové proteiny mají vliv na elasticitu a tažnost těsta, vliv albuminů a globulinů je významný především po výživové stránce pro svůj vysoký obsah esenciálních aminokyselin [22].

Vlivem vysokých teplot dochází ke zvýšení obsahu pšeničných bílkovin. Při vysoké teplotě se v pšenici indukuje syntéza gliadinů na úkor gluteninů, takže se zvýší obsah gliadinové a sníží obsah gluteninové frakce. Jestliže na rostlinu působí současně více stresorů, jako třeba vysoká teplota a deficit vody, dochází k výraznému nárůstu obsahu gluteninů oproti stavu, kdy se na rostlinu působí jediným stresorem. Mezi albuminy a globuliny nejsou pozorovány změny v jejich obsahu [55]. Vlivem vysoké teploty dochází ke zvýšení obsahu ω -, α - a β -gliadinů, ale ke snížení obsahu γ -gliadinů [57]. Zároveň dochází ke snížení obsahu HMW gluteninových podjednotek [58]. García del Moral a kol. [53] prokázali ukládání gliadinů v podmínkách vysokých teplot a sucha na úkor albuminů a globulinů. Naproti tomu Zhang a kol. [59] objevili, že vlivem sucha nedošlo ke změnám v obsahu globulinů a gluteninů, ale zvýšil se obsah albuminů a gliadinů. Naopak Flagella a kol. [60] pozorovali výrazný nárůst gluteninů, převážně pak HMW podjednotek vlivem deficitu vody. Rozdíly mohou být způsobeny použitím různých odrůd pšenice.

2.9.3 Vliv na kvalitu pšenice

Flagella a kol. [60] zjistili, že vliv stresových faktorů na rostlinu záleží na době jeho působení (vegetační nebo reprodukční fáze) a na jeho síle. Od toho se pak odvíjí vliv na kvalitu pšenice a bílkovinné složení zrna. Jestliže je sucho v době vegetační fáze růstu rostliny, snižuje se výtěžnost zrna. Jestliže je sucho v reprodukční fázi pšenice, tedy když se zrno plní, dochází k zlepšení síly lepku (vysoké teploty snižují sílu lepku) vlivem nárůstu množství gluteninů. Nejideálnější pro rostlinu a vhodné proteinové složení je zimní deficit vody a následné vlhko na jaře.

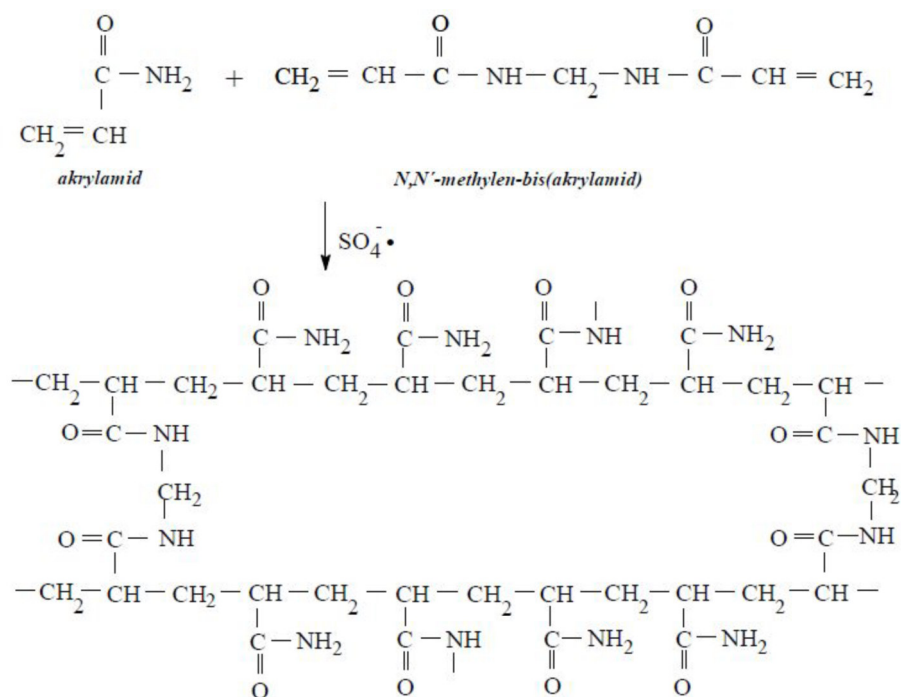
Sucho a velmi vysoké teploty vedou k nižším výtěžkům a zvýšení obsahu proteinů v zrně. Vlivem působení vysoké teploty (32 °C) dochází k významnému snížení obsahu škrobu v zrně, jelikož dochází k inaktivaci škrobové syntázy, a zároveň dochází k poklesu hmotnosti a průměru těchto zrn. Zvyšuje se obsah amylosy, zvyšuje se poměr amylosy a amylopektinu. Vlivem vysokých teplot následně dochází ke gelovatění amylosy. Vlivem sucha během plnění zrna tedy dochází k zhoršení kvality zrna [56]. Jak už bylo řečeno dříve, vždy záleží na odrůdě pšenice.

2.10 Stanovení obsahu lepkových proteinů

Ke stanovení lepkových proteinů se využívá nejčastěji elektromigračních metod. Elektromigrační neboli elektroforetické metody obecně, jak už název napovídá, jsou souborem technik, které využívají pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Látky nesoucí náboj se rozpustí v elektrolytu. Když se dostanou do stejnosměrného elektrického pole, začnou se pohybovat vlivem působení elektrické síly konstantní rychlostí v závislosti na velikosti náboje ke katodě, resp. anodě. V případě, že látky nejsou elektricky nabitě, působí na ně síla odporová, která je silou opačnou k síle elektrické. Při elektroforéze dochází k vyrovnání síly elektrické a odporové. Rychlost pohybu iontů je ovlivněna mnoha faktory, nejenom velikostí náboje. Příkladem faktorů ovlivňujících rychlost mobility jsou viskozita prostředí, teplota, pH roztoku, iontová síla nebo koncentrace pufru užívaného pro elektroforézu. Úspěšnou separaci lze předpokládat pouze v případě, že budou mít separované látky dostatečně odlišné efektivní elektroforetické pohyblivosti. Díky tomu bylo vypracováno několik technik. Máme-li pohyblivé rozhraní, mluvíme o elektroforéze volné. V případě elektroforézy na nosičích mluvíme o zónové elektroforéze a rovnovážná elektroforéza je též označována jako izoelektrická fokusace nebo izotachoforéza [61].

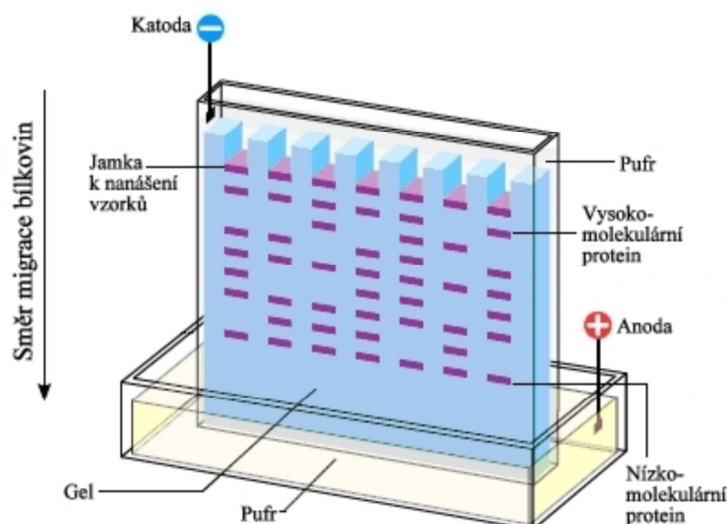
Při separaci se nejčastěji používá polyakrylamidový gel, který je inertní, mechanicky pevný, průhledný a umožňuje přípravu gelů o různé hustotě zesíťování. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu se řadí mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody pro separaci makromolekul. Polyakrylamidový gel se připravuje kopolymerací monomeru akrylamidu a N,N'-methylenbisakrylamidu (BIS) (obrázek 9). Fyzikální vlastnosti gelu jsou velmi podstatně ovlivněny poměrem obou složek. Ovlivňuje například velikost pórů, křehkost, ale i tvrdost gelu. Při vyšší koncentraci obou složek vznikají gely tuhé a křehké, při malých koncentracích naopak gely měkké. Nejčastější celková koncentrace akrylamidu se pohybuje v rozmezí 3–15 % a v porovnání s množstvím akrylamidu se přidává 5 % BIS. Kopolymerace se provádí v roztoku pufru za přítomnosti iniciátoru, kterým je peroxodisíran amonný nebo riboflavin. Když na iniciátor působí světlo, jeho molekuly se rozkládají a vznikají volné

radikály, které jsou zodpovědné za zahájení průběhu polymerační reakce. Vzniklé volné radikály se musí stabilizovat, na což se používá tetramethylethylendiamin (TEMED) nebo dimethylaminopropionitril (DMPN). Jestliže polymerační reakce probíhá za nepřítomnosti vzduchu, vznikají dlouhé lineární řetězce polyakrylamidu, které jsou křížově propojené můstky bifunkčního činidla BIS. Struktura gelu je dána otevřenými póry o určité velikosti, které obsahují kapalinu a pufr. Je-li velikost pórů srovnatelná s velikostí separovaných bílkovinných molekul, vzniká odpor molekul při průchodu gelem a díky tomu se dělí podle své velikosti. Velikost pórů je nepřímo úměrná koncentraci bifunkční složky gelu (BIS) [61][62].



Obrázek 9: Chemická struktura polyakrylamidového gelu.

Gel může být v trubičkách nebo v tenké vrstvě mezi dvěma skleněnými deskami. Zásadní při dělení není typ a tvar gelu, ale zda probíhá v kontinuálním nebo diskontinuálním prostředí. Diskontinuita bývá buď v koncentracích gelu, nebo převážně v pH a iontové síle. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu bývá často prováděna diskontinuálně, kdy se používají dva různé gely. Mezi elektroforetická skla je nalit separační gel, který se po jeho ztuhnutí překryje vrstvou zaostřovacího gelu. Zaostřovací gel má velké póry. Jeho úkolem je zakoncentrovat bílkoviny. V separačním gelu dochází k separaci v závislosti na pohyblivosti molekul (obrázek 10). K detekci separovaných molekul se používá barvení pro zviditelnění rozdělených proužků, které odpovídají jednotlivým bílkovinám. K barvení se nejčastěji používá alkoholový roztok s barvivem Coomassie blue. Dochází k zafixování a denaturaci proteinů, které tvoří komplex barvivo-protein. Vymývání přebytečného barviva se provádí kyselým roztokem nebo elektroforetickým odbarvením. Intenzita zbarvení proužků je přímo úměrná koncentraci proteinu. Pro detekci méně koncentrovaných bílkovin se používá barvení stříbrem. Ke kvantifikaci se používá počítačová denzitometrie, která převede jednotlivé zóny na píky. Chceme-li vypočítat hodnotu koncentrace stanovovaného proteinu, musíme porovnat plochu píku určitého proteinu s plochou píku standardu [61][62].



Obrázek 10: Aparatura pro diskontinuální polyakrylamidovou elektroforézu [62].

2.10.1 Stanovení obsahu gliadinů – A-PAGE

Elektroforéza v kyselém prostředí (A-PAGE) je metoda využívaná pro stanovení gliadinů bez přítomnosti denaturačního činidla, tedy v nativním stavu. Nedochází tedy k denuraci molekul, takže zůstává zachována struktura bílkovin. Dělení probíhá na základě rozdílné velikosti, tvaru a náboje molekul [63]. Je to jedna z nejpraktičtějších a nejvýkonnějších metod pro dělení makromolekul. Jedná se o tzv. zónovou elektroforézu (elektroforéza na nosiči) v kyselém prostředí o pH 3, které je zajištěno přítomností kyseliny octové a glycinu. Tím je zajištěno kladné nabití všech proteinů v elektrickém poli a ty tím pádem putují ke katodě [64]. Název metody je odvozen od pohybu vzorku na pevném podkladu, v tomto případě na porézním polyakrylamidovém gelu. Velké molekuly mají menší elektroforetickou mobilitu a za malými molekulami se opoždějí. Důležitou roli hraje také teplota gelu, jelikož vlivem teploty dochází ke změně pKa pufrových iontů a analytů [63]. Často se využívá močovina, která ruší vodíkové můstky v proteinech a zajišťuje tak vyšší rozpustnost hydrofobních proteinů [40][61]. Zároveň močovina zvyšuje součinitel tření proteinů, čímž mění jejich elektroforetickou mobilitu [64]. Metoda se dá využít i pro stanovení gluteninů [65].

2.10.2 Stanovení obsahu gluteninů – SDS-PAGE

Jako nejběžnější metoda pro separaci proteinů se využívá SDS-PAGE (obrázek 11), tedy elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), který se váže na bílkoviny v poměru přibližně 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny, čímž jim udává uniformní, záporný náboj, který překrývá vlastní náboj proteinu a dojde k částečnému narovnání řetězce vlivem denaturace. Proteiny mají shodný poměr náboje na jednotku hmoty, takže dochází k dělení na základě rozdílných molekulových hmotností. SDS poruší nekovalentní interakce mezi podjednotkami bílkovin a po přidání SDS v kombinaci s 2-merkptoethanolem nebo dithiotreitem (DTT) se redukuje také disulfidické můstky a lze tak stanovit molekulovou hmotnost jednotlivých podjednotek. Následkem je, že se bílkoviny dělí na základě rozdílné molekulové hmotnosti. Nevýhodou metody je, že nepodává informaci o nativním stavu bílkoviny [61].

SDS-PAGE se dá využít jak pro gluteninové, tak pro gliadinové lepkové bílkoviny, ale častěji se využívá při stanovení gluteninů. U gliadinů není tak jasné rozlišení jednotlivých frakcí jako u gluteninů. Navíc většina gliadinových frakcí sdílí oblast mobility s gluteniny [24]. Výhodnější a mnohem rychlejší metodou pro stanovení HMW gluteninových podjednotek je využití čipové elektroforézy. Tato metoda poskytuje velmi dobrou reprodukovatelnost. Další výhodou této metody jsou nižší požadavky na objem vzorků, reagensů a standardů bílkovin [66].



Obrázek 11: Komerčně dostupná aparatura pro SDS-PAGE [62].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Experiment provedli pracovníci Ústavu výzkumu globální změny Akademie věd České republiky ve spolupráci s Mendelovou univerzitou. Pro experiment byly použity čtyři genotypy pšenice seté: Bohemia, Pannonia, Tobak a RGT Reform (dále v práci označovaný pouze jako RGT). Osivo bylo zaseto v říjnu 2014 do černých plastových nádob o vnitřních rozměrech 10,5 × 10,5 × 21,5 cm. Do každé nádoby byla zaseta dvě zrna. Použitá půda pro pěstování pšenice pocházela z experimentální stanice v Polkovicích na Moravě. Půdní typ byl klasifikován různými měřeními jako luviská černozem s půdotvorným substrátem spraš. Nádoby byly v hale Mendelovy univerzity v Brně vystaveny okolním meteorologickým podmínkám až do dosažení fáze naduřování horní listové pochvy, která předchází fázi metání. Pro ochranu před zmrznutím byl použit okolo nádob keramzit. V březnu 2015 proběhlo jednorázové hnojení vodným roztokem dusičnanu amonného v koncentraci 0,29 g dusičnanu na 14 ml vody na jednu nádobu. Vzorky byly ošetřeny fungicidy a insekticidy. V květnu 2015 byly převezeny do Ústavu globální změny AV ČR, kde byly umístěny do kultivačních komor pro aklimatizaci na jednotlivé teploty.

Pro hodnocení vlivu vysoké teploty a nedostatku půdní vláhy v období kvetení byly v komorách simulovány podmínky stresu teplem s teplotními maximy 26 °C v kontrolní komoře, 29 °C, 32 °C, 35 °C, 38 °C a 41 °C. Pro absenci nebo nedostatečné množství vzorků kultivovaných při 41 °C s nimi nebyl experiment prováděn. V tabulce 5 jsou uvedeny podmínky v jednotlivých komorách. Různé teploty v každé komoře, ale stejné podmínky pro fotosynteticky aktivní radiaci (FAR) a relativní vlhkost (RV) ve všech komorách. V každé komoře byla varianta stresovaná suchem, při které byla vlhkost půdy udržována pod 30 %, a varianta kontrolní, optimálně zalévaná, s vlhkostí půdy nad 70 %. Rostliny byly po 14 dnech stresového režimu vyjmuty z komor a do období plné zralosti byly vystaveny vlivům aktuálního počasí. Po sklizni byly vzorky zrn rozemlety na mouku a byly dále zpracovány postupem popsáním v další kapitole.

Tabulka 5: Podmínky v kultivačních komorách (K) – denní teploty (Komora 1 = kontrolované podmínky), fotosynteticky aktivní radiace (FAR) a relativní vlhkost (RV).

Čas	K 1 t (°C)	K 2 t (°C)	K 3 t (°C)	K 4 t (°C)	K 5 t (°C)	K 6 t (°C)	FAR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	RV (%)
0:00	20	20	20	20	20	20	0	85
4:00	18	18	18	18	18	18	0	90
6:00	18	18	18	18	18	18	0	90
12:00	26	29	32	35	38	41	1500	45
14:00	26	29	32	35	38	41	1500	45
20:00	22	22	22	22	22	22	0	75
24:00	20	20	20	20	20	20	0	85

3.2 Stanovení obsahu gliadinů – A-PAGE

Stanovení bylo provedeno podle metody Polišenské a kol. [67] a ČSN 46 1085-2. Gliadiny byly extrahovány 25% roztokem 2-chlorethanolu. Na gel se dávkovalo 5 ml vzorku. Elektroforéza probíhala při pH 3,2, při stabilizovaném napětí 480 V. Tím došlo k separaci molekul podle hmotnosti a povahy povrchového náboje. Fixace a barvení probíhalo v 300 ml fixačního roztoku smíchaných s 15 ml barvicího roztoku. Barvení bylo ukončeno zhruba po 20 hodinách, jelikož delším barvením už nedochází k patrným změnám.

3.2.1 *Přístroje*

Analytické váhy HR-120-EC firmy HELAGO® CZ Hradec Králové – parametry: kapacita 120g, nejmenší dílek 0,1 mg, atest ČMI

Centrifuga 5430 R firmy EPPENDORF

Vortex – stuart firmy MERCI

Vortex – Genie 2 firmy SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC.

Chladnička s mrazničkou firmy GORENJE

Aparatura pro vertikální elektroforézu s chlazením – Owl Separation Systems, Inc., Portsmouth, NH USA

Zdroj – Major Science MP-500P

Třepačka KS 130 BASIC firmy IKA

3.2.2 *Chemikálie*

Akrylamid; Sigma ALDRICH

N,N'-methylenbisakrylamid; Sigma ALDRICH

Močovina; LACHEMA

Kyselina askorbová; Sigma ALDRICH

Síran železnatý heptahydrát; LACHEMA

Peroxodisíran amonný; Sigma ALDRICH

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin; Sigma ALDRICH

2-chlorethanol; Sigma ALDRICH

Pyronin Y; Sigma ALDRICH

Kyselina octová; Sigma ALDRICH

Glycin; Sigma ALDRICH

Kyselina trichloroctová; Sigma ALDRICH

Coomasie Brilliant Blue R-250; Sigma ALDRICH

Coomasie Brilliant Blue G-250; SERVA

3.2.3 *Příprava roztoků*

3.2.3.1 *Extrakční roztok pro gliadiny*

25 ml 2-chlorethanolu a 0,05 g pyroninu Y bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

3.2.3.2 0,15% vodný roztok síranu železnatého

V 5 ml destilované vody bylo rozpuštěno 0,014 g heptahydrátu síranu železnatého. Před každým použitím byl připraven nový roztok.

3.2.3.3 10% vodný roztok peroxodisíranu amonného

V 1 ml destilované vody bylo rozpuštěno 0,1 g peroxodisíranu amonného. Před každým použitím byl připraven nový roztok.

3.2.3.4 Gelový tlumivý roztok

Bylo smícháno 1000 ml destilované vody s 20 ml ledové kyseliny octové a v roztoku byl rozpuštěn 1,00 g glycinu. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

3.2.3.5 Elektrodový tlumivý roztok

V 8,0 ml ledové kyseliny octové bylo rozpuštěno 0,8 g glycinu. Roztok byl kvantitativně převeden do 2000 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

3.2.3.6 Fixační roztok

100 g kyseliny trichloroctové bylo kvantitativně převedeno do 1000 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 20 °C.

3.2.3.7 Barvicí roztok

0,50 g Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,50 g Coomassie Brilliant Blue G-250 bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno ethanolem po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 20 °C.

3.2.4 Příprava vzorků

Pro extrakci gliadinů bylo do mikrozkuřavky Eppendorf o objemu 1,5 ml naváženo 50 mg pšeničné mouky. Tato hmotnost přibližně odpovídá hmotnosti jednoho zrna. K navážce bylo přidáno 0,3 ml extrakčního roztoku pro gliadiny. Obsah uzavřené mikrozkuřavky Eppendorf byl důkladně promíchán na vortexu a byl nechán přes noc v lednici. Druhý den byla směs odstředěna při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Supernatant byl odpipetován do čisté mikrozkuřavky a použit pro elektroforézu. Hotové extrakty byly uchovávány v mrazničce při teplotě -18 °C.

3.2.5 Příprava polyakrylamidového gelu

Do asi 60 ml gelového tlumivého roztoku bylo v následujícím pořadí přidáno 10,00 g akrylamidu, 0,40 g bisakrylamidu, 6,00 g močoviny, 0,10 g kyseliny askorbové a 3,4 ml roztoku síranu železnatého. Směs byla promíchána a doplněna do 100 ml gelovým tlumivým

roztokem. Směs byla vychlazená na teplotu asi 6 °C. Do vychlazeného roztoku bylo přidáno současně 0,2 ml roztoku peroxodisíranu amonného a 0,3 ml TEMED. Roztok byl ihned nalit do gelové kazety předem vychlazené na 6 °C. Do horní části kazety byl umístěn hřeben k vytvoření jamek pro dávkování vzorků. Polymerace probíhá během 5 minut. Gel je možné použít po 60 minutách od zpolymerování gelu nebo je možné jej uchovat do druhého dne v ledničce.

3.2.6 Elektroforéza

Hřeben byl vytažen z gelu. Jamky pro dávkování vzorků byly promyty elektrodoým tlumivým roztokem. Aparatura na elektroforézu byla naplněna elektrodoým tlumivým roztokem. Zdroj byl připojen tak, aby elektroforetické dělení probíhalo od horní elektrody (anoda) ke spodní záporně nabitě elektrodě (katoda) aparatury. Byla spuštěna elektroforéza naprázdno („předelektroforéza“) po dobu 60 minut při konstantním napětí 480 V. Poté byla elektroforéza vypnuta a do jamek byly nadávkovány připravené, těsně před dávkováním zcentrifugované, extrakty v množství 5 µl. Byla spuštěna elektroforéza za stejných podmínek, kdy asi 2 hodiny trvalo, než doputovalo barvivo (pyronin Y) na konec gelu (rychlejší než vzorky), a poté elektroforéza probíhala ještě 2 hodiny. Celkem tedy elektroforéza trvala přibližně 4 hodiny. Vzhledem k velikosti vloženého napětí bylo nutné předejít zahřívání aparatury a elektrodoý tlumivý roztok v průběhu elektroforézy chladit.

3.2.7 Fixace a vizualizace bílkovin

Po skončení elektroforézy byl gel uvolněn do misky s destilovanou vodou. Voda z misky byla vylita a gel byl převrstven 300 ml fixačního roztoku, ke kterému bylo přidáno 15 ml barvicího roztoku. Gel musí být během barvení zcela ponořen. Miska s gelem byla umístěna na třepačku. Barvení probíhalo 20 hodin. Delší čas nemá na barvení vliv. Po ukončení barvení byl gel promyt vodou z vodovodu pro odstranění nadbytečného barviva. Gel byl převeden na sklo a zabalen do potravinářské fólie, která gel chrání před vysycháním. V této podobě byl uchováván v lednici při teplotě 4 °C.

3.2.8 Vyhodnocení gelů

Hotové gely byly naskenovány do počítače pomocí HP Scanjet. Kvantifikace byla provedena počítačovou denzitometrií pomocí programu Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.1. Zóny jednotlivých podjednotek byly převedeny na píky (intenzita zbarvení proti vzdálenosti od okraje gelu) a integrací byla vypočítána jejich plocha. Kvůli nedostupnosti standardu nebyly tyto plochy píků přepočteny na koncentraci. Pro porovnání jednotlivých variant byly použity příslušné plochy píků.

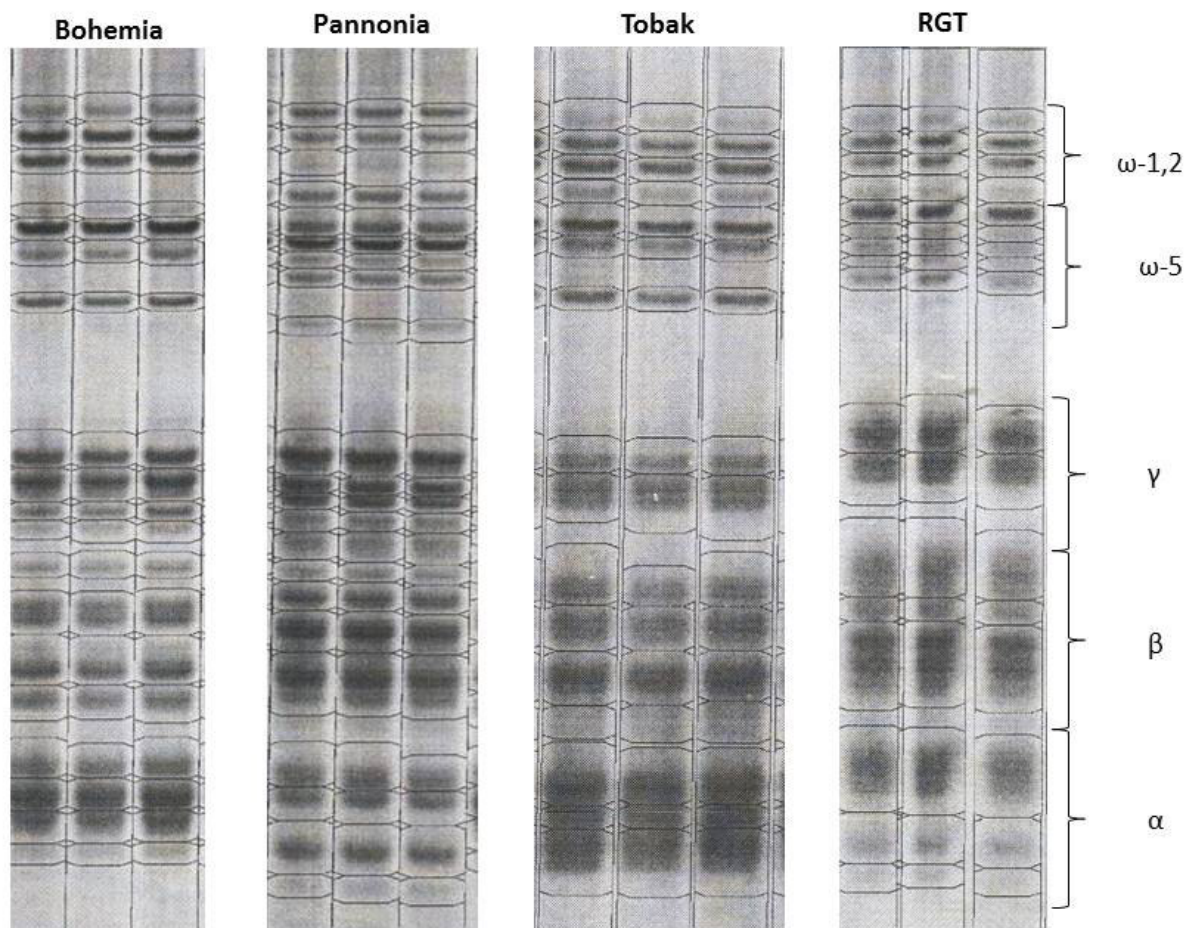
3.2.9 Statistické zpracování výsledků

Statistická analýza dat byla provedena pomocí statistického software Statistica 12 (StatSoft, USA). Pro vyhodnocení vlivu jednotlivých faktorů, tj. vlivu teploty, stresu sucha, odrůdy a jejich vzájemných interakcí bylo použito vícefaktorové analýzy variance (ANOVA). Pro porovnání průkaznosti rozdílů mezi průměry jednotlivých variant pak bylo využito následného (post-hoc) testování s použitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$. Pro porovnání průkaznosti rozdílů mezi průměry pak byly varianty zařazeny do homogenních skupin, které jsou v grafech vyznačeny pomocí malých písmen nad, resp. pod body. Rozdílná písmena vyjadřují průkazný rozdíl při hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$. Výsledky byly graficky zpracovány v programu SigmaPlot 11 (SysStat, USA) ve formě bodových grafů s chybovými úsečkami znázorňujícími směrodatné odchylky.

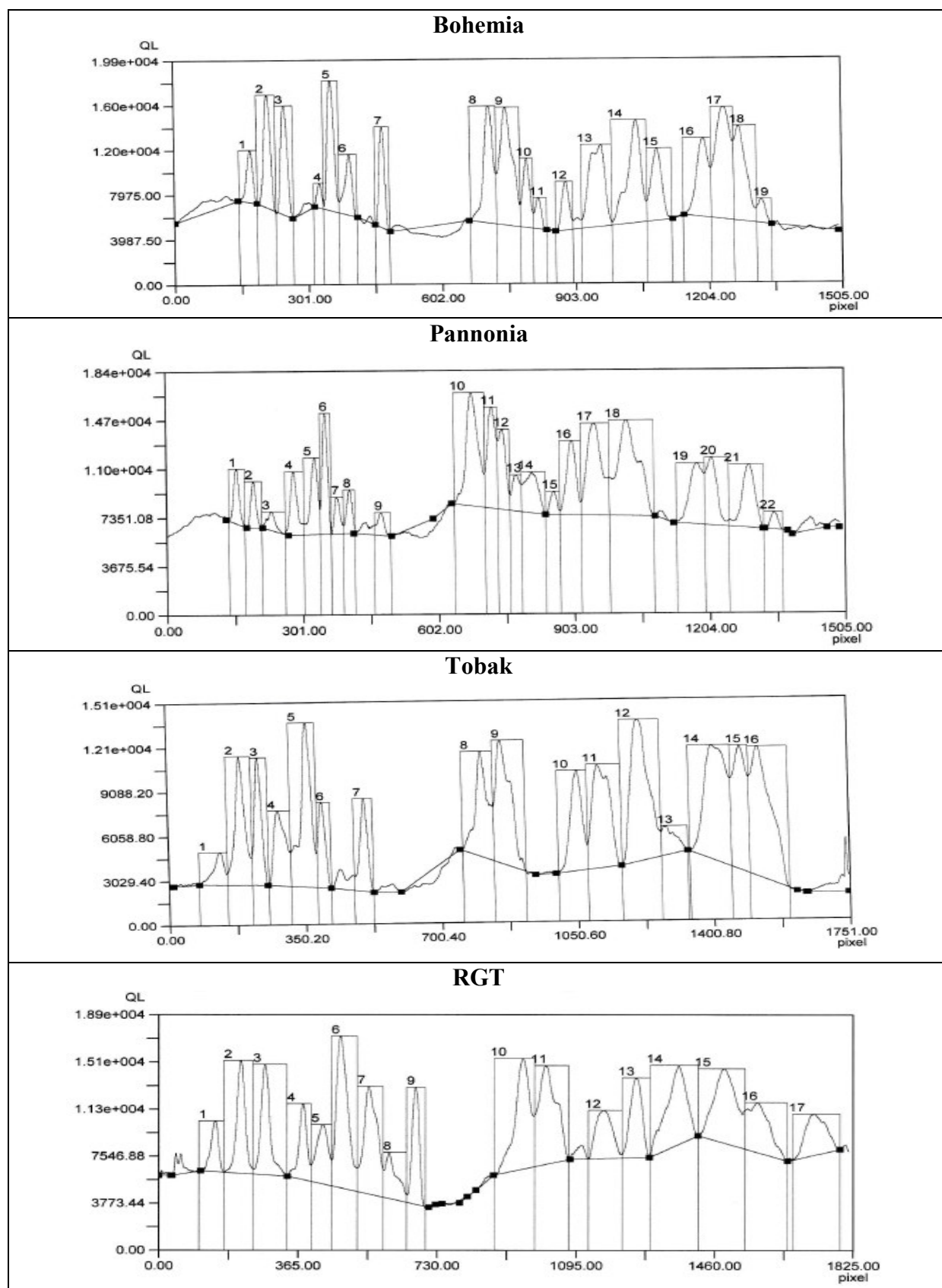
V programu Canoco 5 byla provedena vícerozměrná analýza hlavních komponent PCA (principal component analysis), resp. redundanční analýza (RDA analýza), pro zjištění vlivu sledovaných faktorů na jednotlivé gliadinové frakce.

4 VÝSLEDKY

Na obrázku 12 jsou zobrazeny ukázky polyakrylamidových gelů pro jednotlivé odrůdy pšenice seté (Bohemia, Pannonia, Tobak, RGT), které byly získány prací na experimentální části této diplomové práce. Gely byly získány metodou A-PAGE a znázorňují rozdělení gliadinových proteinů do jednotlivých frakcí. Získané gely byly naskenovány a jednotlivé zóny byly počítačovou denzitometrií převedeny na píky (obrázek 13), jejichž plocha byla využita k dalšímu vyhodnocování.



Obrázek 12: A-PAGE gliadinových proteinů čtyř odrůd pšenice seté – Bohemia, Pannonia, Tobak, RGT - s popisem gliadinových frakcí.

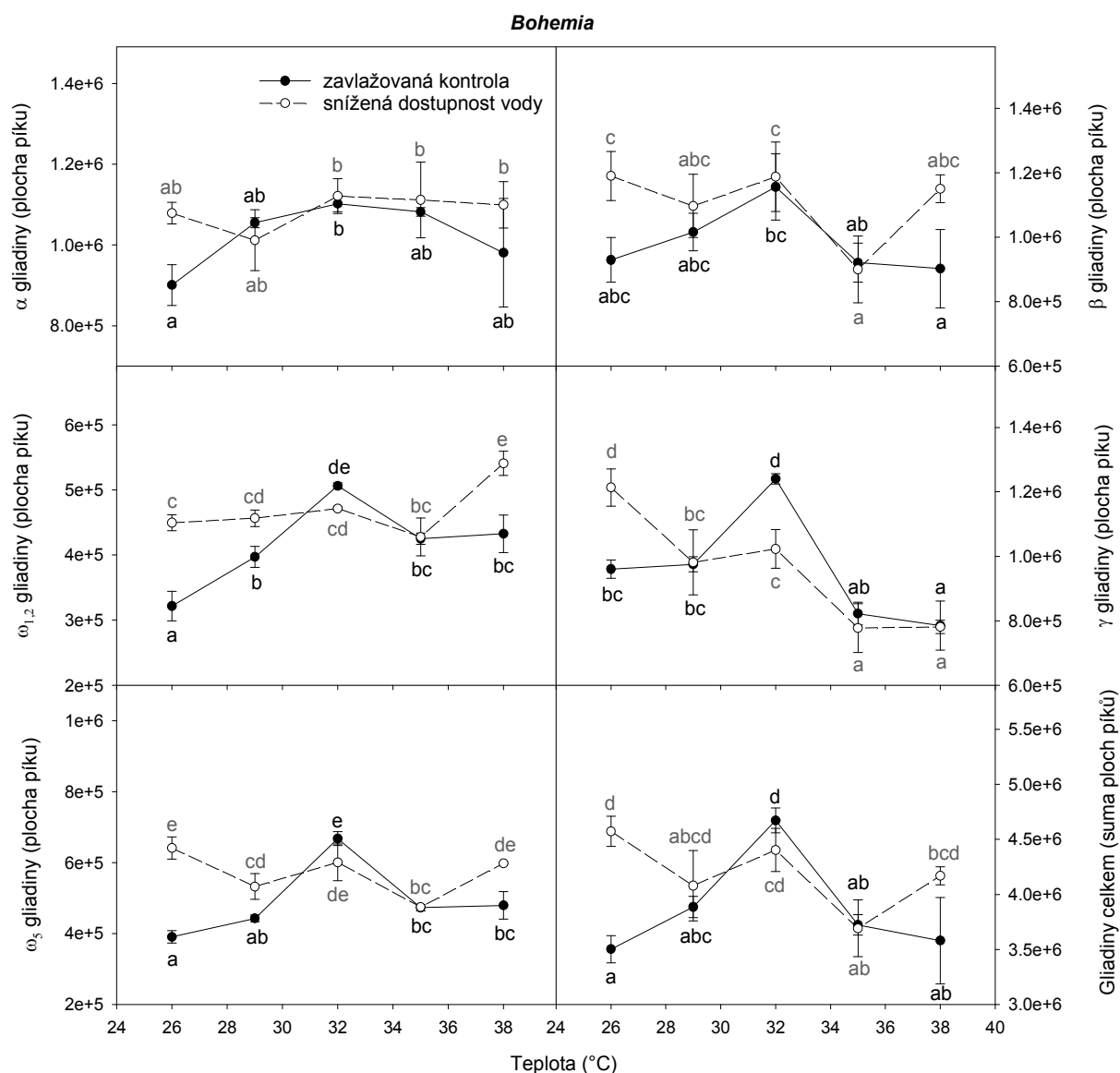


Obrázek 13: Počítačová denzitometrie. Zóny rozdělených fragmentů bílkovin převedené na píky v rámci A-PAGE gliadinové frakce jednotlivých odrůd pšenice seté o ploše vyznačené na ose y.

Jak je vidět na obrázku 12, už podle gelu jsou mezi odrůdami okem viditelné rozdíly v zastoupení jednotlivých gliadinových frakcí. To potvrzují i spektra píků na obrázku 13.

Podle obrázku 13 lze vidět, že nejbohatší na jednotlivé gliadinové frakce je odrůda Pannonia. Od ostatních odrůd se liší zejména vyšším počtem jednotlivých frakcí γ -gliadinů. Množství γ -gliadinových frakcí je až pět a celkově má až dvacet dva frakcí gliadinů. Spolu s odrůdou RGT má šest frakcí ω -5-gliadinů, ostatní dvě odrůdy mají jen čtyři frakce ω -5-gliadinů. Množství frakcí γ -gliadinů u odrůdy RGT je však velice nízký oproti odrůdě Pannonia, jelikož obsahuje pouze dvě tyto frakce. Stejně tak pouze dvě frakce γ -gliadinů obsahuje odrůda Tobak. Srovnatelné u všech odrůd je množství ω -1,2-gliadinů a β -gliadinů. Všechny odrůdy obsahují čtyři frakce ω -1,2-gliadinů a tři nebo čtyři frakce β -gliadinů. Odrůdy Bohemia a Pannonia obsahují čtyři frakce α -gliadinů, odrůdy Tobak a RGT mají o jednu frakci méně. Co se týče celkového množství gliadinových frakcí, nejméně jich obsahuje odrůda Tobak (šestnáct). U odrůdy Bohemia bylo detekováno celkem devatenáct a u odrůdy RGT sedmnáct gliadinových frakcí.

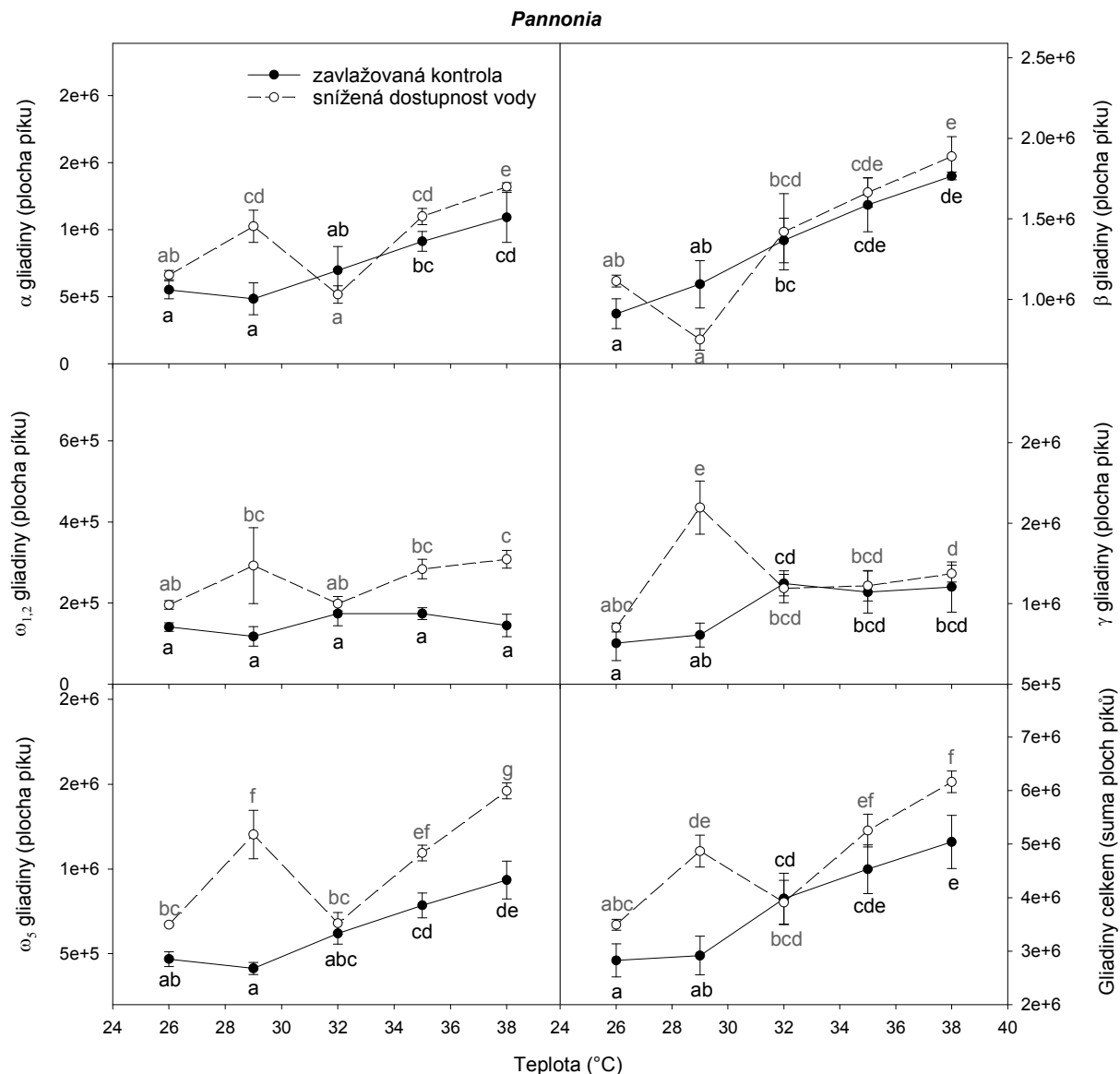
Grafy na obrázku 14 až 17 znázorňují srovnání vlivu teploty a stresu sucha na gliadinové frakce a na jejich celkové množství u jednotlivých odrůd pšenice seté. Body v grafech jsou označeny malými písmeny, která vyjadřují statisticky významný rozdíl mezi variantami (průměry) na základě následného testování ANOVA pomocí Tukeyho testu při hladině průkaznosti $p = 0,05$. Jsou-li porovnávané body označeny stejným písmenem (homogenní skupiny), není mezi nimi statisticky významný rozdíl. Rozdílná písmena vyjadřují průkazný a tedy statisticky významný rozdíl mezi dvěma průměry.



Obrázek 14: Vliv teploty a sucha na obsah jednotlivých frakcí gliadinů a jejich celkové množství v zrně pšenice seté odrůdy Bohemia. Body znázorňují aritmetické průměry s chybovými úsečkami. Chybové úsečky jsou směrodatnými odchylkami ze tří opakování. Rozdílná písmena nad, resp. pod body vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami a byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

Obsah jednotlivých frakcí gliadinů a jejich celkové množství v zrně pšenice seté u odrůdy Bohemia (obrázek 14) se liší. Odrůda Bohemia vykazuje nižší obsah ω -gliadinových frakcí a vyšší obsah α - a β -gliadinových frakcí. Obecně se dá u odrůdy Bohemia říct, že do teploty 32 °C v zavlažovaném stavu (kontrola) roste množství všech gliadinových frakcí v zrně a při dalším zvyšování teploty dochází k poklesu obsahu gliadinových proteinů. Nejmarkantnější nárůst je pozorován u zavlažované varianty při 32 °C u γ -gliadinových frakcí. U rostlin stresovaných sníženou dostupností vody je celkově vyšší obsah gliadinových frakcí, avšak s rostoucí teplotou dochází spíše k snižování jejich množství oproti zavlažovanému stavu. Výjimkou je teplota 32 °C a 38 °C, kdy dochází v rostlinách stresovaných sníženou dostupností vody k nárůstu jednotlivých gliadinových proteinů.

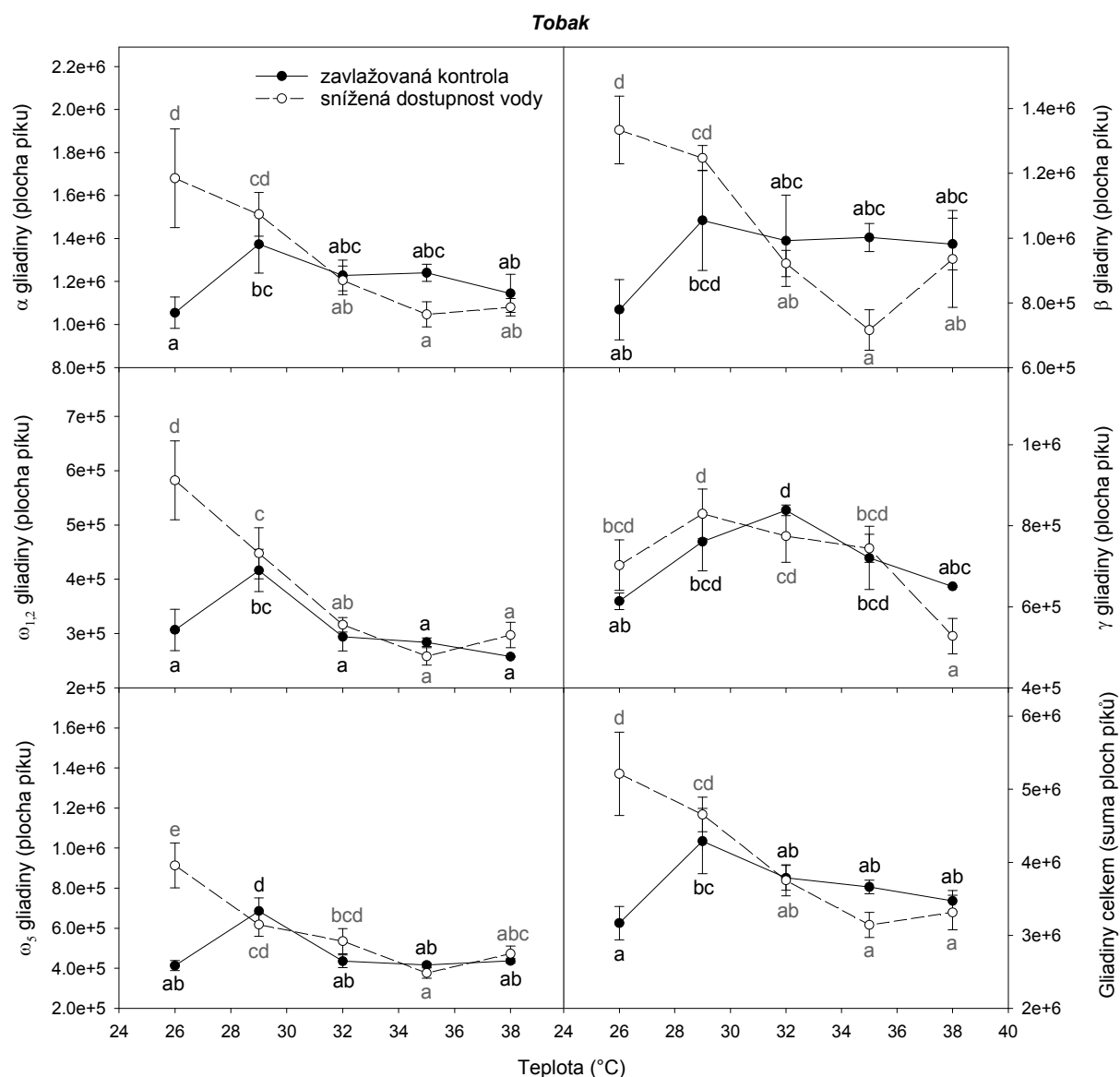
Podle výsledků ANOVA má teplota statisticky průkazný efekt na všechny frakce gliadinů, nejmenší statisticky průkazný efekt však má na α -gliadiny. Vliv dostupnosti vody má také statisticky průkazný efekt na všechny gliadinové frakce s výjimkou γ -gliadinů. Nejnížší efekt má voda opět na α -gliadinové frakce. Vliv teploty a snížené dostupnosti vody v interakci má statisticky neprůkazný efekt na α -gliadinové frakce a velice nízký statisticky průkazný efekt na β -gliadiny. Všechny tyto výsledky vycházely z testování v rámci analýzy variance (ANOVA). U odrůdy Bohemia dochází vlivem snížené dostupnosti vody k statisticky neprůkaznému poklesu α -gliadinových frakcí při teplotě 29 °C, při ostatních teplotách dochází k statisticky neprůkaznému nárůstu jejich obsahu. U β -gliadinů dochází vlivem snížené dostupnosti vody nejprve k poklesu množství při teplotě 29 °C, následně obsah narůstá do teploty 32 °C, poté opět množství β -gliadinů klesá do teploty 35 °C a do teploty 38 °C zase jejich obsah roste. Všechny tyto efekty na β -gliadinové frakce jsou statisticky neprůkazné. Vlivem snížené dostupnosti vody na γ -gliadinové frakce dochází převážně k poklesu jejich obsahu při všech teplotách, avšak pouze při 26 °C a 32 °C je tento vliv statisticky průkazný. Vliv snížené dostupnosti vody na ω -5-gliadiny odpovídá stejnému trendu jako u β -gliadinů, s výjimkou toho, že jev je neprůkazný pouze při 32 °C a 35 °C, na rozdíl od β -gliadinů. Na ω -1,2-gliadiny má snížená dostupnost vody vliv až od teploty 32 °C, kdy následně dochází k statisticky neprůkaznému poklesu jejich obsahu až do teploty 35 °C a pak se jejich obsah průkazně zvyšuje. O celkovém množství gliadinů v zrnech pšenice seté odrůdy Bohemia se dá říct, že vliv snížené dostupnosti vody kopíruje trend, jaký jsme pozorovali u ω -5-gliadinů.



Obrázek 15: Vliv teploty a sucha na obsah jednotlivých frakcí gliadinů a jejich celkové množství v zrně pšenice seté odrůdy Pannonia. Body znázorňují aritmetické průměry s chybovými úsečkami. Chybové úsečky jsou směrodatnými odchylkami ze tří opakování. Rozdílná písmena nad, resp. pod body vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami a byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

Obsah jednotlivých frakcí gliadinů a jejich celkové množství v zrně pšenice seté u odrůdy Pannonia (obrázek 15) se příliš neliší. Odrůda Pannonia vykazuje nižší obsah ω -1,2-gliadinových frakcí a vyšší obsah β -gliadinových frakcí. V zavlažovaném stavu (kontrola) od teploty 29 °C množství všech gliadinových frakcí v zrně roste s výjimkou ω -1,2-gliadinů. Nejmarkantnější nárůst byl pozorován u zavlažované varianty β -gliadinových frakcí, stejně je tomu i u suché varianty. U rostlin stresovaných sníženou dostupností vody je celkově vyšší obsah gliadinových frakcí, avšak při teplotě 29 °C nejprve dochází k znatelnému nárůstu množství gliadinových frakcí, při teplotě 32 °C dochází k snížení jejich množství a následně už jejich obsah jen roste. Tomuto trendu odpovídá i celkové množství zastoupených gliadinů

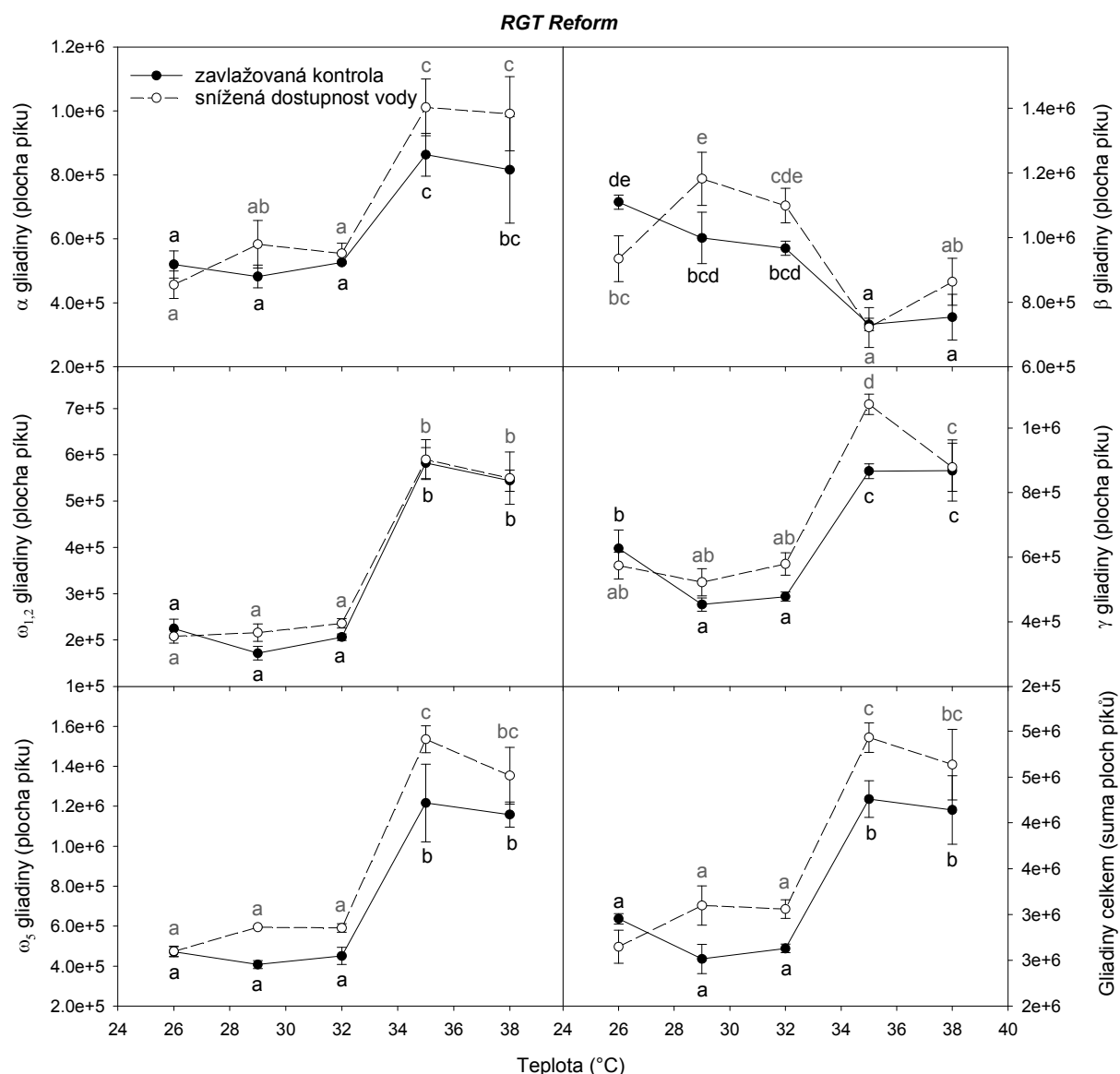
v rostlině. Výjimkou jsou β -gliadinové frakce, které u rostlin stresovaných sníženou dostupností vody nejprve při teplotě 29 °C sníží svůj obsah v zrně rostliny a následně dochází k růstu jejich množství. Podle výsledků ANOVA má teplota statisticky průkazný efekt na všechny frakce gliadinů s výjimkou kontrolní varianty u ω -1,2-gliadinů. Vliv dostupnosti vody má taktéž statisticky průkazný efekt na všechny gliadinové frakce s výjimkou β -gliadinů, na které má voda statisticky neprůkazný efekt. Vliv teploty a snížené dostupnosti vody v interakci má statisticky průkazný efekt na všechny gliadinové frakce, nejmenší statisticky průkazný efekt však má na β -gliadiny. Všechny tyto výsledky vycházely z testování v rámci analýzy variance (ANOVA). U odrůdy Pannonia dochází vlivem snížené dostupnosti vody k statisticky průkaznému nárůstu α -gliadinových frakcí při teplotě 29 °C, následně jejich obsah neprůkazně klesá do teploty 32 °C a poté jejich množství opět roste. Do teploty 35 °C je růst obsahu α -gliadinových frakcí statisticky neprůkazný, u vyšších teplot je statisticky průkazný. U β -gliadinů dochází vlivem snížené dostupnosti vody nejprve k poklesu množství při teplotě 29 °C a následně obsah narůstá při všech teplotách. Všechny tyto efekty na β -gliadinové frakce jsou statisticky neprůkazné. Vliv snížené dostupnosti vody na γ -gliadinové frakce odpovídá stejnému trendu jako u α -gliadinů, nárůst však není tak markantní. Vliv snížené dostupnosti vody na ω -5-gliadiny odpovídá taktéž stejnému trendu jako u α -gliadinů, s výjimkou toho, že jev je průkazný už při teplotě 35 °C, na rozdíl od α -gliadinů. Na ω -1,2-gliadiny má snížená dostupnost vody vliv stejný jako u ω -5-gliadinů. O celkovém množství gliadinů v zrnech pšenice seté odrůdy Pannonia se dá říct, že vliv snížené dostupnosti vody kopíruje trend, jaký jsme pozorovali u α -gliadinů.



Obrázek 16: Vliv teploty a sucha na obsah jednotlivých frakcí gliadinů a jejich celkové množství v zrně pšenice seté odrůdy Tobak. Body znázorňují aritmetické průměry s chybovými úsečkami. Chybové úsečky jsou směrodatnými odchylkami ze tří opakování. Rozdílná písmena nad, resp. pod body vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami a byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

Obsah jednotlivých frakcí gliadinů a jejich celkové množství v zrně pšenice seté u odrůdy Tobak (obrázek 16) se liší. Odrůda Tobak vykazuje nižší obsah ω -1,2-gliadinových frakcí a vyšší obsah α - a β -gliadinových frakcí. Obecně se dá o odrůdě Tobak říct, že v zavlažovaném stavu (kontrola) nejprve dochází k velkému nárůstu množství gliadinů a od teploty 29 °C množství všech gliadinových frakcí v zrně klesá. Výjimkou jsou γ -gliadiny, u kterých dochází k snížení množství až od teploty 32 °C. U ω -gliadinů je jejich množství takřka konstantní od teploty 32 °C a k dalšímu poklesu obsahu nedochází. Dá se tedy říct, že teplota nemá při teplotách nad 32 °C na ω -5-gliadiny pozorovatelný vliv. U rostlin stresovaných sníženou dostupností vody je vyšší obsah gliadinových frakcí (s výjimkou γ -gliadinů) při teplotě 26 °C, a potom jejich množství klesá. Celkové množství gliadinů kopíruje

trendy odpovídající většině gliadinových frakcí jak u rostlin v zavlažovaném stavu, tak u rostlin stresovaných sníženou dostupností vody, které jsou popsány výše v tomto odstavci. Podle výsledků ANOVA má teplota statisticky průkazný efekt na všechny frakce gliadinů. Vliv dostupnosti vody má statisticky průkazný efekt na obě skupiny ω -gliadinů, na α -gliadiny a na celkové gliadiny, kdy nejslabší vliv dostupnosti vody je na α -gliadinové frakce. Na β - a γ -gliadiny má voda statisticky neprůkazný efekt. Vliv teploty a snížené dostupnosti vody v interakci má statisticky průkazný efekt na všechny gliadinové frakce, nejmenší statisticky průkazný efekt však má na γ -gliadiny. Všechny tyto výsledky vycházejí z testování v rámci analýzy variance (ANOVA). U odrůdy Tobak dochází vlivem snížené dostupnosti vody k statisticky průkaznému poklesu α -gliadinových frakcí při teplotě 26 °C, následně jejich obsah neprůkazně klesá do teploty 35 °C a poté jejich množství mírně roste. U β -gliadinů dochází vlivem snížené dostupnosti vody nejprve k poklesu množství při teplotě 29 °C až 35 °C a následně obsah narůstá při teplotě nad 35 °C. Vliv snížené dostupnosti vody na β - gliadinové frakce odpovídá bez rozdílu stejnému trendu jako u α -gliadinů. Vliv snížené dostupnosti vody na γ -gliadinové frakce je zcela odlišný od vlivu na ostatní frakce. Nejprve dochází k statisticky neprůkaznému nárůstu množství γ -gliadinů do teploty 29 °C, poté jejich obsah statisticky neprůkazně klesá. Nejmarkantnější pokles obsahu γ -gliadinů nastává při teplotě nad 35 °C. Vliv snížené dostupnosti vody na ω -5-gliadiny odpovídá stejnému trendu jako u α -gliadinů. Na ω -1,2-gliadiny má snížená dostupnost vody vliv stejný jako u ω -5-gliadinů. O celkovém množství gliadinů v zrnech pšenice seté odrůdy Tobak se dá říci, že vliv snížené dostupnosti vody kopíruje trend, jaký jsme pozorovali u α -gliadinů.

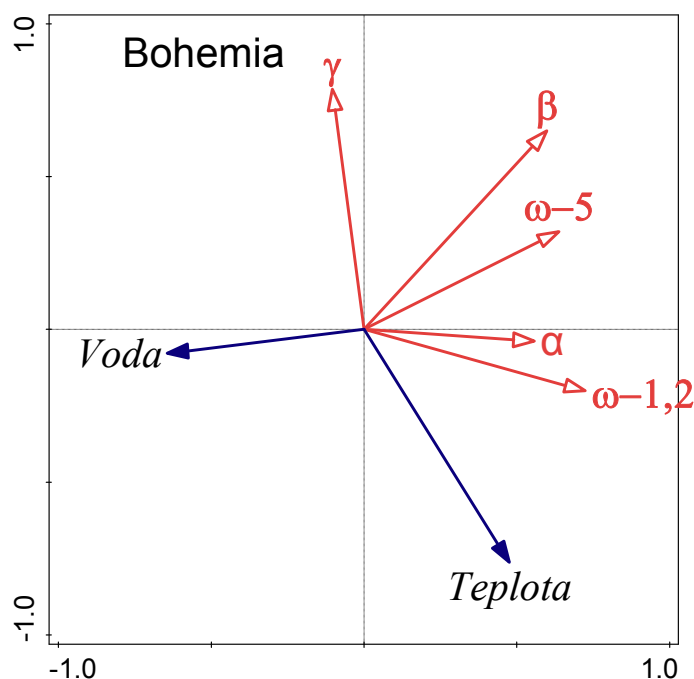


Obrázek 17: Vliv teploty a sucha na obsah jednotlivých frakcí gliadinů a jejich celkové množství v zrně pšenice seté odrůdy RGT Reform. Body znázorňují aritmetické průměry s chybovými úsečkami. Chybové úsečky jsou směrodatnými odchylkami ze tří opakování. Rozdílná písmena nad, resp. pod body vyjadřují průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami a byla vyhodnocena následným testováním v rámci analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

Obsah jednotlivých frakcí gliadinů a jejich celkové množství v zrně pšenice seté u odrůdy RGT Reform (obrázek 17) se liší. Odrůda RGT Reform vykazuje nižší obsah ω -1,2-gliadinových frakcí a vyšší obsah β -gliadinových frakcí, ale při teplotách nad 32 °C je v zrně nejvíce ω -5-gliadinových frakcí. Obecně se dá o odrůdě RGT Reform říct, že v zavlažovaném stavu (kontrola) je obsah gliadinových frakcí i celkových gliadinů konstantní (v rámci statistické chyby) v rozmezí 26–32 °C, pak dochází k prudkému nárůstu a od 35 °C je obsah gliadinů opět víceméně konstantní. Výjimkou jsou β -gliadiny, u kterých dochází k poklesu jejich obsahu až do teploty 35 °C a poté se jejich množství nepatrně zvyšuje. γ -gliadiny odpovídají trendu s jedinou výjimkou, a to, že nad teplotou 35 °C je jejich obsah konstantní. U rostlin stresovaných sníženou dostupností vody je celkově vyšší obsah gliadinových frakcí,

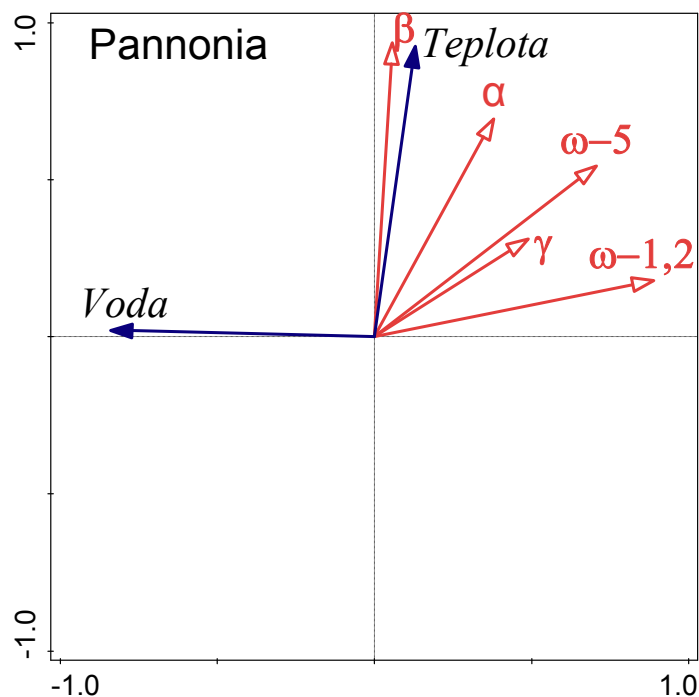
jinak je teplotní závislost obsahu gliadinů stejná jako u kontrolní skupiny. Nejmarkantnější nárůst nastává u ω -5-gliadinů. Výjimkou jsou β -gliadiny, které nejprve svůj obsah v zrně zvyšují, od teploty 29 °C jejich množství klesá, od teploty 32 °C jejich množství razantně narůstá a při teplotě nad 35 °C své množství opět snižují. Nejmarkantnější nárůst nastává u ω -5-gliadinů. Výjimkou jsou β -gliadiny, které neodpovídají zmíněnému trendu. Jejich obsah se nejprve zvyšuje až do teploty 29 °C, následně dochází k poklesu jejich množství a od teploty 35 °C jejich množství opět roste. U γ -gliadinů je jediná změna proti trendu, a to, že do teploty 29 °C zůstává jejich množství konstantní. Celkové množství gliadinů kopíruje trendy odpovídající většině gliadinových frakcí jak u rostlin v zavlažovaném stavu, tak u rostlin stresovaných sníženou dostupností vody, které jsou popsány výše v tomto odstavci. Podle výsledků ANOVA má teplota statisticky průkazný efekt na všechny frakce gliadinů o stejné intenzitě. Vliv dostupnosti vody má statisticky průkazný efekt na všechny gliadinové frakce s výjimkou ω -1,2-gliadinů, kdy nejslabší vliv dostupnosti vody je na β -gliadinové frakce. Vliv teploty a snížené dostupnosti vody v interakci má statisticky průkazný efekt pouze na β -, γ - a celkové gliadinové frakce, nejmenší statisticky průkazný efekt má na celkové gliadiny. Na ostatní frakce má statisticky neprůkazný efekt. Všechny tyto výsledky vycházely z testování v rámci analýzy variance (ANOVA). U odrůdy RGT Reform při snížené dostupnosti vody je obsah gliadinových frakcí i celkových gliadinů konstantní v rozmezí 26–32 °C, následně prudce roste až do teploty 35 °C a poté opět klesá. Vliv snížené dostupnosti vody na α -gliadiny je statisticky neprůkazný v celém svém průběhu. U β -gliadinů dochází vlivem snížené dostupnosti vody nejprve k statisticky průkaznému nárůstu množství při teplotě 26 °C až 29 °C, následně jejich množství statisticky neprůkazně klesá až do teploty 35 °C a následně obsah statisticky neprůkazně narůstá při teplotě nad 35 °C. Vliv snížené dostupnosti vody na γ -gliadinové frakce odpovídá stejnému trendu jako u α -gliadinů, pouze při teplotě 35 °C se obsah zvyšuje průkazně. Vliv snížené dostupnosti vody na ω -5-gliadiny odpovídá stejnému trendu jako u γ -gliadinů. Na ω -1,2-gliadiny má snížená dostupnost vody vliv stejný jako u α -gliadinů. O celkovém množství gliadinů v zrnech pšenice seté odrůdy RGT Reform se dá říct, že vliv snížené dostupnosti vody kopíruje trend, jaký jsme pozorovali u γ -gliadinů.

Pomocí redundanční analýzy (RDA), která je formou vícerozměrné analýzy hlavních komponent PCA (principal component analysis), byly získány grafy na obrázku 18 až 21. Grafy ukazují vliv sledovaných faktorů, které jsou zobrazené pomocí modrých šipek, na jednotlivé frakce gliadinových proteinů u jednotlivých odrůd, které jsou zobrazeny červenými šipkami. Jestliže má červená šipka s modrou šipkou stejný nebo podobný směr, jedná se o pozitivní vliv daného faktoru na příslušnou gliadinovou frakci. Opačný směr šipek ukazuje negativní vliv daného faktoru na příslušnou gliadinovou frakci. Délka červené šipky nám pak objasňuje, jak velký vliv daného faktoru na příslušnou frakci pozorujeme. Jestliže šipky svírají pravý úhel, znamená to, že daný faktor neovlivňuje množství pozorované frakce. U teploty pozorujeme přímo úměrný vliv na množství dané frakce, pokud máme stejný směr modré šipky pro teplotu a červené šipky. V tomto případě to znamená, že čím bude vyšší teplota, tím více bude i dané frakce gliadinů v zrně. U vody pozorujeme taktéž přímo úměrný vliv na množství dané frakce, pokud máme stejný směr modré šipky pro vodu a červené šipky. V tomto případě to znamená, že čím bude mít rostlina větší přísun vody, tím více dané frakce gliadinů bude v zrně obsaženo. U jednotlivých odrůd se však vliv obou faktorů liší.



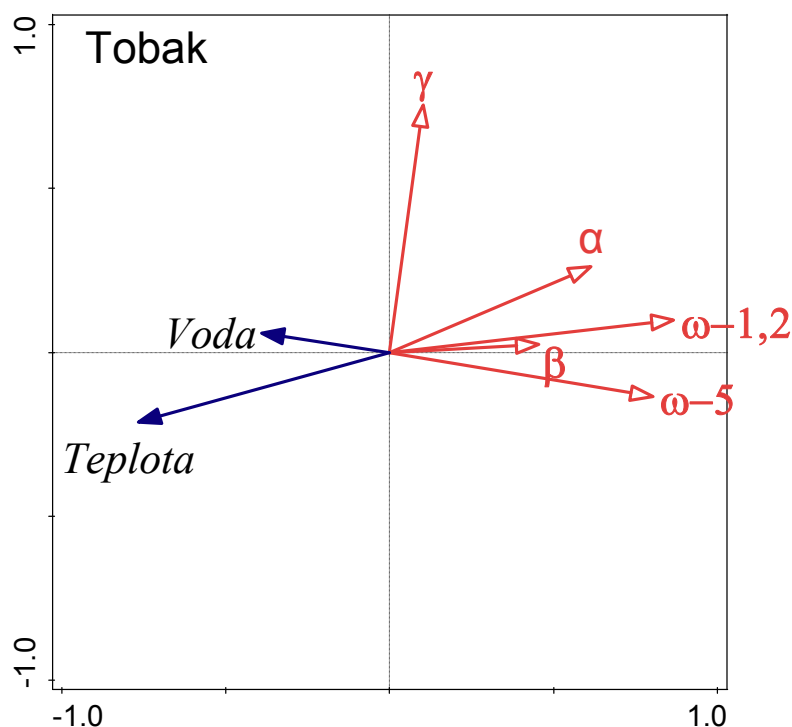
Obrázek 18: Biplot graf RDA analýzy vlivu teploty a dostupnosti vody na obsah jednotlivých gliadinových frakcí u pšenice seté odrůdy Bohemia.

Z grafu RDA analýzy pro odrůdu Bohemia (obrázek 18) je zřejmé, že teplota má silně negativní vliv na množství γ -gliadinů a slabý negativní vliv na β -gliadiny. Na ω -5-gliadinové frakce nemá teplota žádný vliv, na α - a ω -1,2-gliadiny má pouze slabě pozitivní vliv. Na dostupnost vody nejvíce reagují α -gliadiny, jejichž množství s rostoucí dostupností vody klesá nejvíce. Kromě γ -gliadinů má dostupnost vody negativní vliv na všechny ostatní frakce gliadinů. Na γ -gliadiny nemá dostupnost vody žádný vliv. Vliv dostupnosti vody nemá pozitivní vliv na žádnou gliadinovou frakci.



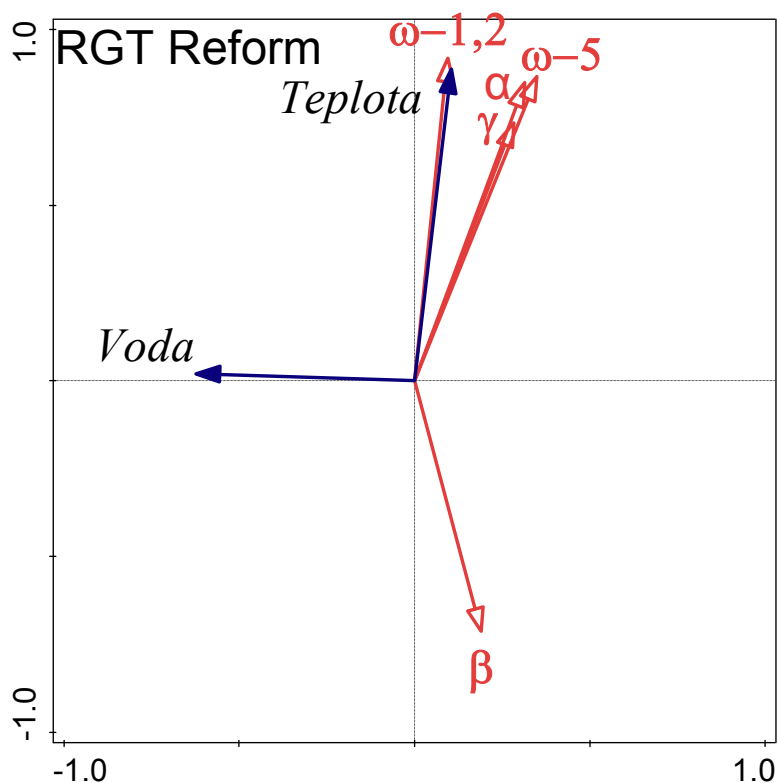
Obrázek 19: Biplot graf RDA analýzy vlivu teploty a dostupnosti vody na obsah jednotlivých gliadinových frakcí u pšenice seté odrůdy Pannonia.

Z grafu RDA analýzy pro odrůdu Pannonia (obrázek 19) je zřejmý výrazný vliv teploty i dostupnosti vody na zastoupení gliadinových frakcí v zrně. Z grafu jde vidět, že teplota má silně pozitivní vliv na množství β -gliadinů, méně silný pozitivní vliv na α -gliadiny a postupně tento vliv slábne, až teplota prakticky ztrácí vliv na obsah frakcí, jako je tomu např. u ω -1,2-gliadinů. Teplota nemá negativní vliv na žádnou gliadinovou frakci odrůdy Pannonia. Na dostupnost vody nejvíce reagují ω -1,2-gliadiny, jejichž množství s rostoucí dostupností vody klesá nejvíce. Kromě β -gliadinů má dostupnost vody negativní vliv na všechny ostatní frakce gliadinů. Na β -gliadiny nemá dostupnost vody žádný vliv. Vliv dostupnosti vody nemá pozitivní vliv na žádnou gliadinovou frakci. O odrůdě Pannonia se dá říct, že je silně citlivá jak na teplotu, tak na dostupnost vody.



Obrázek 20: Biplot graf RDA analýzy vlivu teploty a dostupnosti vody na obsah jednotlivých gliadinových frakcí u pšenice seté odrůdy Tobak.

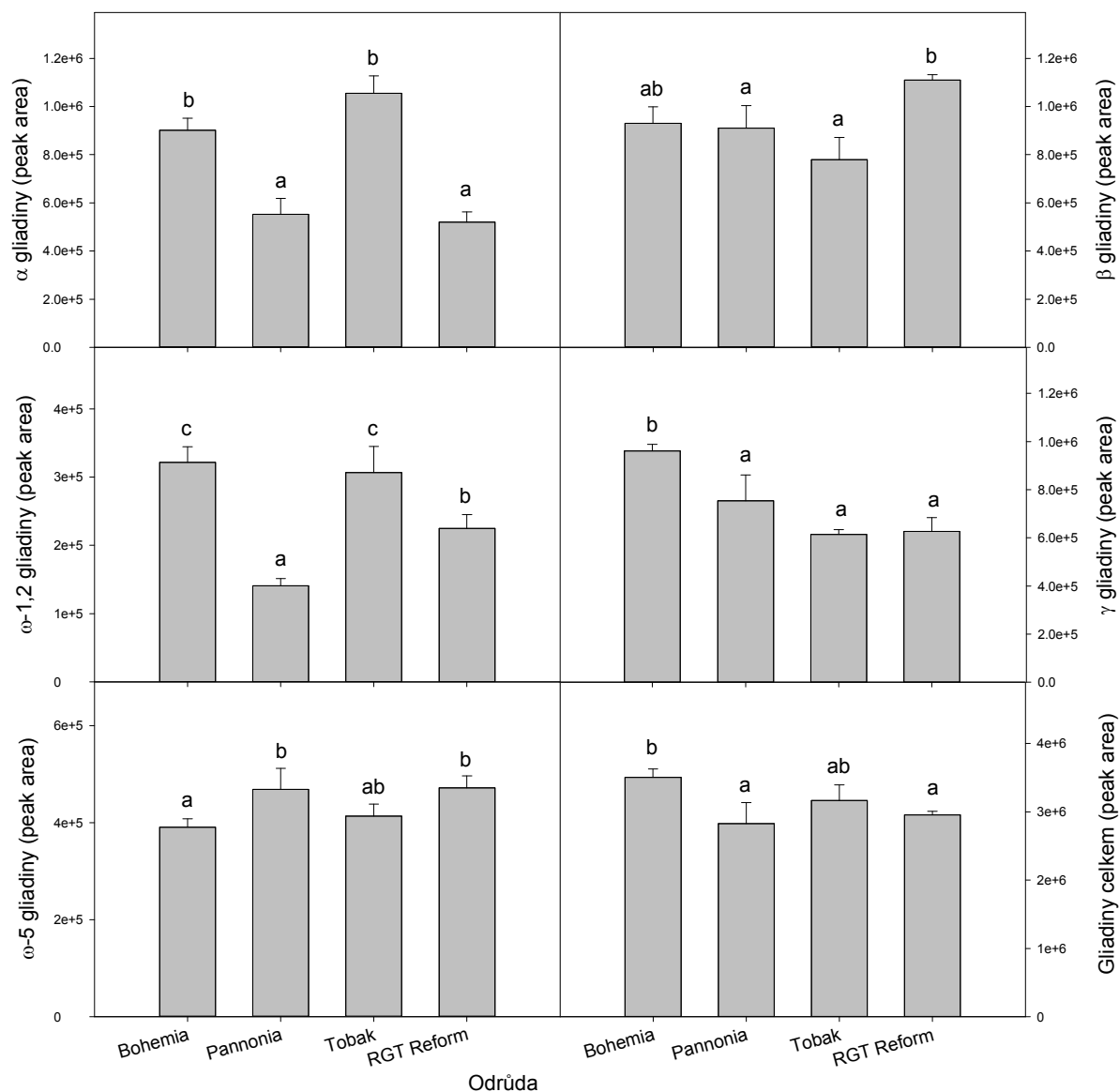
Z grafu RDA analýzy pro odrůdu Tobak (obrázek 20) je zřejmý výrazný vliv teploty i dostupnosti vody na zastoupení gliadinových frakcí v zrně. Z grafu jde vidět, že teplota má silně negativní vliv na množství α -gliadinů, méně silný negativní vliv na obě skupiny ω -gliadinů a β -gliadiny. Teplota má jen velmi slabý negativní vliv na obsah γ -gliadinů. Teplota nemá pozitivní vliv na žádnou gliadinovou frakci odrůdy Tobak. Na dostupnost vody nejvíce reagují ω -5-gliadiny, jejichž množství s rostoucí dostupností vody klesá nejvíce. Kromě γ -gliadinů má dostupnost vody negativní vliv na všechny ostatní frakce gliadinů. Na γ -gliadiny nemá dostupnost vody žádný vliv. Celkově se o odrůdě Tobak dá říct, že je málo citlivá na vliv dostupnosti vody.



Obrázek 21: Biplot graf RDA analýzy vlivu teploty a dostupnosti vody na obsah jednotlivých gliadinových frakcí u pšenice seté odrůdy RGT Reform.

Z grafu RDA analýzy pro odrůdu RGT Reform (obrázek 21) je zřejmý výrazný vliv teploty na zastoupení gliadinových frakcí v zrně. Z grafu jde vidět, že teplota má silně pozitivní vliv na množství $\omega-1,2$ -gliadinů a jen o málo menší pozitivní vliv na ostatní skupiny gliadinů s výjimkou β -gliadinů. Teplota má silný negativní vliv na obsah β -gliadinů. Na dostupnost vody nereagují prakticky žádné skupiny gliadinů. Celkově se o odrůdě RGT Reform dá říct, že je odolná na vliv dostupnosti vody.

Následující grafy na obrázku 22 znázorňují srovnání zastoupení jednotlivých gliadinových frakcí v závislosti na odrůdě pšenice seté při 26 °C v zavlažovaném stavu. Písemné označení nad každým sloupcem v grafu označuje, zda existuje mezi jednotlivými variantami statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p = 0,05$. Tato písmena byla získána pomocí následného testování ANOVA s využitím Tukeyova testu. Jsou-li dva sloupce označeny stejným písmenem, znamená to, že mezi nimi není statisticky významný rozdíl.



Obrázek 22: Graf zobrazující srovnání zastoupení jednotlivých frakcí gliadinů (plocha píků) v závislosti na odrůdě pšenice seté při 26 °C v zavlažovaném stavu. Sloupce označují obsah jednotlivých frakcí u příslušné odrůdy v podobě aritmetického průměru, chybové úsečky směrodatnou odchylku ze tří opakování. Malými písmeny jsou indikovány homogenní skupiny určující průkaznost mezi jednotlivými variantami, vyhodnocené následným testováním pomocí analýzy variance (ANOVA) s využitím Tukeyova testu při hladině významnosti $p = 0,05$.

Z grafu na obrázku 22 lze vidět, že největší obsah α -gliadinových frakcí při 26 °C v zavlažovaném stavu vykazuje odrůda Tobak. V porovnání s ostatními odrůdami množství α -gliadinové frakce při 26 °C se statisticky průkazně snižuje u odrůd Pannonia a RGT Reform. U odrůdy Bohemia nebyl prokázán statisticky průkazný efekt. Obsah α -gliadinů u odrůd Pannonia a RGT Reform je přibližně stejný. Největší obsah β -gliadinových frakcí při 26 °C v zavlažovaném stavu vykazuje odrůda RGT Reform. Obsah této frakce je průkazně vyšší než u odrůd Pannonia a Tobak. Rozdíly mezi ostatními odrůdami jsou statisticky nevýznamné. Největší obsah γ -gliadinových frakcí při 26 °C v zavlažovaném stavu vykazuje odrůda Bohemia. Množství této frakce je statisticky průkazně vyšší než u ostatních odrůd.

Ostatní odrůdy se mezi sebou v obsahu γ -gliadinových frakcí příliš neliší. Meziodrůdové rozdíly v obsahu ω -5-gliadinových frakcí při 26 °C v zavlažovaném stavu jsou na hranici statistické významnosti. Nejnížší obsah ω -5-gliadinových frakcí je pozorován u odrůdy Bohemia. Největší obsah ω -1,2-gliadinových frakcí při 26 °C v zavlažovaném stavu vykazuje odrůda Bohemia. Množství této frakce má statisticky neprůkazný efekt na snížení obsahu u odrůdy Tobak, ale průkazný efekt s odrůdami Pannonia a RGT Reform. Všechny ostatní dvojice odrůd, kromě odrůd Bohemia a Tobak, vykazují statisticky průkazný efekt na snížení obsahu této frakce. Nejnížší obsah ω -1,2-gliadinových frakcí byl pozorován u odrůdy Pannonia. Celkový obsah gliadinů byl nejvyšší u odrůdy Bohemia, rozdíly mezi ostatními odrůdami jsou statisticky nevýznamné. Pro shrnutí se dá říct, že odrůda Bohemia obsahuje při 26 °C v zavlažovaném stavu ve svém zrně nejvíce γ -gliadinových frakcí, odrůda RGT Reform při stejných podmínkách obsahuje nejvíce β -gliadinových frakcí a odrůda Tobak obsahuje nejvíce α -gliadinových frakcí. Velké meziodrůdové rozdíly vykazují frakce α - a ω -1,2-gliadinů.

5 DISKUSE

V této diplomové práci byl sledován vliv teploty, nedostatku vody a rovněž jejich interakce, na složení a obsah gliadinů u čtyř odrůd pšenice seté, a to Bohemie, Pannonie, Tobaku a RGT Reform. Dále byly porovnány rozdíly v zastoupení jednotlivých frakcí mezi odrůdami.

U jednotlivých odrůd byla zaznamenána rozdílná odezva na teplotu. Nejvýznamnější reakce na teplotu byly pozorovány u odrůd Pannonia a RGT Reform. Odrůda Tobak reaguje na teplotu pouze v interakci se suchem a odrůda Bohemia na teplotu prakticky nereaguje. U odrůdy Pannonia docházelo k nárůstu obsahu téměř u všech frakcí gliadinů s výjimkou γ -gliadinů, jejichž množství se výrazně zvýšilo pouze při teplotě 29 °C. Největší nárůst s rostoucí teplotou byl pozorován u β -gliadinů. U odrůdy RGT Reform docházelo k nárůstu obsahu prakticky všech frakcí gliadinů, s výjimkou β -gliadinů, jejichž množství s teplotou klesalo. Největší nárůst byl pozorován u ω -5-gliadinů, zejména pak při vyšších teplotách (nad 32 °C). U obou odrůd tvoří β -gliadiny největší podíl gliadinových frakcí a u obou odrůd dochází ke zvýšení celkových gliadinů. Odrůda Bohemia vykazuje podobné teplotní závislosti u všech gliadinových frakcí s maximem při teplotě 32 °C a nebyl u ní zaznamenán významný teplotní vliv na množství jednotlivých frakcí. U odrůdy Tobak se snižuje množství všech gliadinových frakcí od teploty 29 °C. Zjednodušeně se dá říct, že obsah jednotlivých frakcí u všech odrůd při vysokých teplotách klesá, s výjimkou odrůdy Pannonia, u které dochází k růstu obsahu gliadinových frakcí u všech sledovaných teplot. U odrůdy Tobak dochází naopak k snižování množství všech gliadinových frakcí u vyšších teplot. Výsledky, které jsme dostali u odrůdy Pannonia, se shodují s dostupnou literaturou, ve které Daniel a kol. [57] uvádí zvýšení gliadinových frakcí vlivem vysokých teplot. Ke stejným závěrům dochází také Gupta a kol. [68]. U ostatních odrůd jsme se rozcházel s výsledky uvedených studií.

Na množství gliadinových frakcí v zrně se nejvíce projevil vliv dostupnosti vody. Stresové prostředí vytvořené nedostatkem vláhy způsobilo relativní nárůst gliadinových frakcí ve srovnání s pěstováním v běžných podmínkách. Při stresu vytvořeném nedostatkem vláhy je více ovlivňován metabolismus škrobu než metabolismus proteinů. Rostliny nasyntetizují méně škrobu, proto je v zrně relativně více proteinů, tedy i gliadinů. Mezi jednotlivými odrůdami byly zaznamenány rozdíly už u rozdělených lepkových bílkovin na gelech. Největší obsah gliadinových frakcí v podmínkách nedostatku vláhy bylo zjištěno u odrůdy Pannonia, naopak nejmenší u odrůdy RGT Reform. Největší obsah gliadinových frakcí v podmínkách dostatku vláhy bylo zjištěno u odrůd Bohemia a Pannonia, naopak nejméně opět u odrůdy RGT Reform. Z toho lze usoudit, že největší vliv nedostatku vláhy se projevil u odrůdy Pannonia, naopak odrůda RGT Reform je vůči nedostatku vláhy velmi odolná. I zastoupení jednotlivých gliadinových frakcí mezi odrůdami se výrazně lišilo. Nejvyšší podíl α -gliadinů vykazovala v podmínkách stresu odrůda Tobak (přes 30 %), nejnižší potom odrůdy Pannonia a RGT Reform (20 %). Nejvyšší podíl β -gliadinů vykazovala v podmínkách nedostatku vláhy odrůda Pannonia (okolo 30 %), nejnižší potom odrůda Tobak (okolo 25 %). Nejvyšší podíl γ -gliadinů vykazovala v podmínkách nedostatku vláhy odrůda Pannonia (25%), nejnižší potom odrůda Tobak (18 %). Nejvyšší podíl ω -5-gliadinů vykazovala v podmínkách nedostatku vláhy odrůda RGT Reform (okolo 25 %), nejnižší potom odrůdy Bohemia a Tobak (okolo 14 %). Podíl ω -1,2-gliadinů v podmínkách nedostatku vláhy byl u všech odrůd srovnatelně

nízký a příliš se nelišil. Nejvyšší podíl α -gliadinů vykazovala v podmínkách dostatečného přísunu vláhy odrůda Tobak (přes 30 %), nejnižší potom odrůdy Pannonia a RGT Reform (20 %). Výsledky tedy byly stejné jako při podmínkách nedostatku vláhy. Nejvyšší podíl β -gliadinů vykazovala v podmínkách dostatečného přísunu vláhy odrůda Pannonia (35 %), nejnižší potom odrůda Bohemia (25 %). Nejvyšší podíl γ -gliadinů vykazovaly v podmínkách dostatečného přísunu vláhy odrůdy Bohemia a Pannonia (25%), nejnižší potom odrůdy Tobak a RGT Reform (20 %). Nejvyšší podíl ω -5-gliadinů vykazovala v podmínkách dostatečného přísunu vláhy odrůda RGT Reform (23 %), nejnižší potom odrůdy Bohemia a Tobak (13 %). Tyto výsledky byly opět stejné jako při podmínkách nedostatku vláhy. Podíl ω -1,2-gliadinů v podmínkách dostatečného přísunu vláhy byl nejnižší u odrůdy Pannonia (4 %), u všech ostatních odrůd bylo množství srovnatelné (okolo 10 %).

Je víc než jasné, že složení lepkových proteinů se může mezi odrůdami lišit. Některé naše výsledky se však dost liší od hodnot uváděných Wieserem [37]. Například množství α -gliadinů uvádí v rozmezí 28–32 %, což v našem případě splňuje pouze odrůda Tobak, ať už v podmínkách dostatečného přísunu vláhy, tak v podmínkách stresu nedostatkem vláhy. Stejně tak u γ -gliadinů, Wieser ve stejném článku uvádí rozmezí zastoupení 23–31 %. Všechny odrůdy v našich experimentech se drží spíše při spodní hranici obsahu γ -gliadinů v zrně a odrůda Tobak této hranice vůbec nedosahuje. Naopak množství ω -5-gliadinů je od uváděných 3–6 % celkového obsahu v našem případě podstatně vyšší u všech odrůd, nejvyšší pak u odrůdy RGT Reform [37]. Zörb a kol. [69] uvádí, že v prostředí stresovaném suchem dochází k snížení obsahu γ -gliadinů, k mírnému zvýšení obsahu ω -gliadinů a u α - a β -gliadinů nedochází k výrazným změnám. U našich výsledků vlivem sucha dochází k zvýšení obsahu gliadinů, což je tedy v rozporu s výsledky Zörba a kol. [69]. Zhang a kol. [70] zaznamenali nárůst celkové koncentrace gliadinů při vystavení pšenice nedostatku vody. Tyto závěry naše výsledky potvrzují zejména u odrůdy Pannonia a RGT Reform.

Vliv sucha se často projevuje v interakci s vlivem teploty. Nejvýrazněji se projevuje vliv sucha v interakci s teplotou u odrůdy Tobak. Při teplotách 26 až 32 °C stres sucha způsobuje snížení obsahu všech gliadinových frakcí, kromě γ -gliadinů, ale při teplotě nad 32 °C se obsahy těchto frakcí zvyšují, což má stejný vliv i na celkové gliadiny. Obzvláště zajímavý je u všech odrůd, kromě RGT Reform, častý nárůst většiny gliadinových frakcí při kombinaci nejvyšší teploty 35 °C a nedostatku vody. To může být vysvětleno na základě výsledků uvedených v práci Hlaváčové a kol. [71], kteří při svém experimentu sledovali vliv sucha a teploty na počet zrn v klase a na hmotnost tisíce zrn. Při nejvyšší teplotě 41 °C při stresu nedostatkem vody došli k tomu, že dochází ke snížení počtu zrn v klasu, ale tento úbytek je kompenzován zvýšením hmotnosti tisíce zrn, takže zvýšením obsahu gliadinů. Je tedy velice pravděpodobné, že při teplotě 41 °C by bylo toto zvýšení obsahu většiny gliadinových frakcí podstatně vyšší i u našich odrůd.

Obecně můžeme tedy říci, že působením sucha se zvyšuje obsah gliadinů zejména u odrůdy Pannonia. U ostatních odrůd má sucho vliv převážně ve spojení se stresem teplotním. Odrůda RGT Reform je vůči vlivu nedostatku vláhy velmi odolná. Při současném působení sucha a teploty dochází k nárůstu obsahu gliadinů, což odpovídá výsledkům uvedených v literatuře [53][59]. S těmito závěry nesouhlasí pouze naše výsledky pro odrůdu Tobak, u které dochází vlivem sucha a rostoucí teploty k poklesu většiny gliadinových frakcí až do teploty 35 °C.

Při porovnání zastoupení jednotlivých gliadinových frakcí mezi celkovými gliadiny bylo zjištěno, že u odrůdy Bohemia, Tobak a RGT Reform nebyl vlivem sucha výrazně ovlivněn podíl všech gliadinových frakcí, u odrůdy Pannonia došlo vlivem sucha k výraznému nárůstu β -gliadinových frakcí a k poklesu obsahu ω -5-gliadinových frakcí. U odrůdy Tobak hrálo roli hlavně spojení obou stresových faktorů, díky čemuž došlo k poklesu množství většiny gliadinových frakcí a bylo tedy možné pozorovat nejsilnější vliv obou stresorů. Vlivem rostoucí teploty docházelo u každé odrůdy při určité teplotě k poklesu celkového množství gliadinových frakcí. Nejdříve se tento pokles obsahu projevil u odrůdy RGT Reform, již při 26 °C, ale od teploty 29 °C se obsah gliadinů v zrně opět zvyšoval až do teploty 35 °C, kdy začalo množství gliadinů u odrůdy RGT Reform opět klesat. U odrůdy Tobak nastal pokles množství gliadinových frakcí při teplotě 29 °C a s rostoucí teplotou se množství už jen snižovalo. U odrůdy Bohemia jsme zaznamenali pokles gliadinů v zrně od teploty 32 °C. Výjimkou byla odrůda Pannonia, u které se zvyšoval obsah všech gliadinových frakcí v zrně s rostoucí teplotou. U odrůdy Bohemia byl zaznamenán největší vliv teploty na α -gliadiny, kdy vlivem rostoucí teploty došlo k nárůstu obsahu až do teploty 35 °C. Naopak u γ -gliadinů nastal největší pokles s rostoucí teplotou u odrůdy Bohemia. U odrůdy Pannonia se nejvíce vliv rostoucí teploty projevil u β -gliadinů, kdy nejprve došlo k poklesu jejich množství a od teploty 29 °C jejich množství rostlo. Vliv rostoucí teploty byl velký i u γ - a ω -5-gliadinů odrůdy Pannonia. U odrůdy Tobak byl nejsilnější vliv teploty pozorován u γ -gliadinů. Jejich množství nejprve rostlo a od teploty 32 °C se snižovalo. U odrůdy RGT Reform byl vliv teploty zaznamenán především u β -, γ - a ω -5-gliadinů. Obecně se dá říct, že nejvíce se teplota projevila na γ -gliadinových frakcích všech odrůd pšenice seté. γ -gliadiny jsou rovněž nejvíce citlivé i na nedostatek vody. Tyto výsledky se tedy shodují s výsledky Daniela a kol. [57], kteří došli k závěru, že podíl všech frakcí kromě γ -gliadinů v zrně s teplotou roste, zatímco podíl γ -gliadinů v zrně s teplotou klesá. Ukázkovým příkladem je odrůda Pannonia, která má tomuto trendu nejbližší. Yang a kol. [55] sledovali vliv sucha na lepkové proteiny a zjistili, že při nedostatku vody dochází k poklesu α - a γ -gliadinů, stejně jak tomu bylo i v našem případě u odrůdy Tobak. Dále sledovali vliv vysokých teplot na lepkové proteiny a zaznamenali nárůst α - a γ -gliadinů a pokles α/β - a ω -gliadinů [55]. S těmito výsledky se ty naše neshodují. Nejvíce tomu odpovídala odrůda Pannonia, u které nastal nárůst α - a γ -gliadinů, ale i ω -gliadinů.

Výsledky měření byly podrobeny redundanční analýze. Odrůda Bohemia vykazovala pokles γ -gliadinových frakcí s rostoucí teplotou a jen mírný nárůst α - a ω -1,2-gliadinových frakcí. Vliv teploty byl vesměs negativní. To je však v rozporu s výsledky Hlaváčové a kol. [71], kteří přišli na to, že vlivem vysokých teplot a sucha dochází sice k poklesu počtu zrn, ale zvyšuje se jejich hmotnost a tedy roste množství gliadinů u odrůdy Bohemia. Odrůda Pannonia vykazovala nárůst všech frakcí gliadinů, nejvýraznější nárůst se projevoval u β -gliadinů. Vliv teploty byl téměř zanedbatelný na ω -1,2-gliadiny a vlivem nedostatku vody jejich obsah nejvíce rostl. Odrůda Pannonia tedy odpovídá výsledkům Hlaváčové a kol. [71], a tedy, že s rostoucí teplotou v interakci s nedostatkem vody roste množství všech gliadinových frakcí u odrůdy Pannonia. Kdybychom posuzovali vliv vody na jednotlivé frakce, u β - a α -gliadinů nebyl pozorován vliv na jejich množství, u ostatních frakcí byl pozitivní. U odrůdy Tobak sledovali Hlaváčová a kol. [71] stejný vliv vysokých teplot

a nedostatku vody jako u odrůdy Pannonia, jen s nižší intenzitou. V našem případě je však vliv teploty přesně obrácený a tedy s rostoucí teplotou klesá množství všech gliadinových frakcí. Vliv vody je pozitivní u všech frakcí gliadinů s výjimkou γ -gliadinů. U odrůdy RGT Reform byl sledován silně pozitivní vliv rostoucí teploty s výjimkou β -gliadinů, kde byl vliv teploty silně negativní a zanedbatelný vliv nedostatku vody u všech frakcí. Dalo by se tedy říct, že tato odrůda odpovídá trendu ostatních sledovaných odrůd, jako tomu bylo u výsledků Hlaváčové a kol. [71]. Stejně tak, když se zaměříme na vliv sucha, který je zanedbatelný, částečně se shodujeme s výsledky Zörba a kol. [69], kteří přišli na to, že vlivem sucha klesá množství γ -gliadinů, roste množství ω -gliadinů a vliv na α - a β -gliadiny je zanedbatelný, stejně jak je tomu v našem případě.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo sledování vlivu teploty a sucha na obsah proteinů gliadinové frakce čtyř odrůd pšenice seté.

Pro experiment byly vybrány odrůdy Bohemia, Pannonia, Tobak a RGT Reform. Tyto odrůdy byly kultivovány ve speciálních nádobách s půdou pocházející z experimentální stanice Centra výzkumu globální změny AV ČR v Polkovicích na Moravě. Vzorky byly zasety v říjnu 2014 a až do fáze naduřování horní listové pochvy byly vystaveny okolním meteorologickým podmínkám. V květnu 2015 byly umístěny do kultivačních komor, uvnitř kterých byly simulovány podmínky teplotního stresu a nedostatku vláhy. Rostliny byly stresovému režimu vystaveny po dobu 14 dnů během fáze kvetení a poté byly až do dosažení plné zralosti vystaveny aktuálnímu počasí.

Gliadinové frakce byly separovány v praktické části této diplomové práce metodou A-PAGE podle Polišenské a kol. [67] a normy ČSN 46 1085-2. Obsah jednotlivých gliadinových frakcí byl stanoven počítačovou denzitometrií. K porovnání naměřených dat byly použity příslušné plochy píků. Výsledky byly dále statisticky vyhodnocovány na základě následného testování ANOVA pomocí Tukeyho testu při hladině průkaznosti $p = 0,05$. Dále byla provedena redundanční analýza (RDA), která je formou vícerozměrné analýzy hlavních komponent PCA (principal component analysis).

Na množství gliadinových frakcí v zrně se nejvíce projevil vliv dostupnosti vody. Stresové prostředí vytvořené nedostatkem vláhy způsobilo relativní nárůst gliadinových frakcí ve srovnání s pěstováním v běžných podmínkách. Největší vliv nedostatku vláhy se projevil na zastoupení jednotlivých gliadinových frakcí u odrůdy Pannonia, naopak odrůda RGT Reform je vůči nedostatku vláhy velmi odolná. Vlivem sucha docházelo k zvýšení obsahu gliadinů zejména u odrůdy Pannonia a RGT Reform.

U jednotlivých odrůd byl také pozorován vliv teploty na jednotlivé gliadinové frakce. Na teplotu nejvíce reagovala odrůda Pannonia a RGT Reform, nejméně pak odrůda Bohemia. Odrůda Tobak reagovala na teplotu až v interakci s nedostatkem vody. Vlivem rostoucí teploty docházelo k nárůstu množství prakticky všech gliadinových frakcí u odrůdy Pannonia a RGT Reform. U odrůdy Tobak se obsah gliadinů s rostoucí teplotou naopak snižoval. Zjednodušeně se dá říct, že obsah gliadinů u všech odrůd při vysokých teplotách klesá, s výjimkou odrůdy Pannonia, u které dochází k růstu obsahu gliadinových frakcí u všech sledovaných teplot.

Vliv sucha se často projevuje v interakci s vlivem teploty. Nejvýrazněji se projevuje vliv sucha v interakci s teplotou u odrůdy Tobak. Při současném působení sucha a teploty dochází k nárůstu obsahu gliadinů. Naopak nejmenší vliv sucha v interakci s teplotou se projevuje u odrůdy RGT Reform, jelikož odrůda je velice odolná proti nedostatku vláhy. Obecně se dá říct, že nejvíce se teplota i sucho projevilo na γ -gliadinových frakcích všech zkoumaných odrůd pšenice seté.

7 LITERATURA

- [1] Změna klimatu.cz, *Co je změna klima?* [online]. 2013 [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://www.zmenaklimatu.cz/cz/fakta/zmena-klimatu>
- [2] MAREK, M. *Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícím se klimatu*. 1. Praha: Academia, 2011. ISBN 978-80-904351-1-7.
- [3] Změna klimatu.cz *Jaké jsou její dopady?* [online]. 2013 [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://www.zmenaklimatu.cz/cz/fakta/dusledky>
- [4] *Global Climate Change: Vital Signs of the Planet* [online]. California: NASA, 2018 [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: <https://climate.nasa.gov/>
- [5] NÁTR, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. 1. vyd. Praha: ISV nakladatelství, 2000, 257 s. ISBN 80-85866-62-5.
- [6] EASTERLING, D. R., S. C. PIPER, T. P. WHORF, et al. Climate Extremes: Observations, Modeling, and Impacts. *Science* [online]. 1988, **240**(4850), 293-299 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1126/science.289.5487.2068. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.289.5487.2068>
- [7] RASMUSSEN, C. *Watching plants' water use is no sweat for ECOSTRESS* [online]. 25.6.2018 [cit. 2018-07-03]. Dostupné z: <https://climate.nasa.gov/news/2757/watching-plants-water-use-is-no-sweat-for-ecostress/>
- [8] WAHID, A., S. GELANI, M. ASHRAF a M. R. FOOLAD. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* [online]. 2007, **61**(3), 199-223 [cit. 2018-07-03]. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2007.05.011. ISSN 0098-8472. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>
- [9] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. Praha: Academia, 1999. ISBN 80-200-0600-1.
- [10] BAÑON, S., J.A. FERNANDEZ, J.A. FRANCO, A. TORRECILLAS, J.J. ALARCÓN a M.J. SÁNCHEZ-BLANCO. Effects of water stress and night temperature preconditioning on water relations and morphological and anatomical changes of *Lotus creticus* plants. *Scientia Horticulturae* [online]. Elsevier B.V, 2004, **101**(3), 333-342 [cit. 2018-07-03]. DOI: 10.1016/j.scienta.2003.11.007. ISSN 0304-4238. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.scienta.2003.11.007>
- [11] HRSTKA, Miroslav. *Obecná biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2005. ISBN 8021430575
- [12] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. 1. vyd. Přeložil Arnošt KOTYK. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 8085605449.
- [13] ČEPIČKA, Jaroslav, et al. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 1995. 246 s. ISBN 80-7080-239-1.
- [14] BENDA, Vladimír. *Biologie II: nauka o potravinářských surovinách*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. ISBN 80-7080-402-5.
- [15] PETR, Jiří; LOUDA, František. *Produkce potravinářských surovin*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 1998. 213 s. ISBN 80-7080-332-0.
- [16] FAOSTAT [online]. ©2018 [cit. 2018-07-26]. Dostupné z: <http://www.fao.org/home/en>
- [17] PŘÍHODA, J. HRUŠKOVÁ, M. SKŘIVAN, P. *Cereální chemie a technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-708-0530-7.

- [18] KADLEC, P. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. ISBN 80-708-0509-9.
- [19] BELDEROK, B., J. MESDAG a D. A. DONNER. *Bread-making quality of wheat: a century of breeding in Europe*. Boston: Kluwer Academic Publishers, ©2000. ISBN 07-923-6383-3.
- [20] *ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA* [online]. ©1996 [cit. 2018-07-26]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/>
- [21] SIVAM, A. S., SUN-WATERHOUSE, D. QUEK, S.Y. PERERA, C. O. Properties of Bread Dough with Added Fiber Polysaccharides and Phenolic Antioxidants: A Review. *Journal of Food Science* [online]. 2010, 75(8), R163-R174 [cit. 2018-07-28]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01815.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01815.x>
- [22] BALLA, K., RAKSZEGI, M. LI, Z. BEKES, F. BENCZE S. VEISZ, O. Quality of winter wheat in relation to heat and drought shock after anthesis. *Czech Journal of Food Sciences - UZEI* [online]. 2011, 29(2), 117-128 [cit. 2018-07-28]. ISSN 12121800. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/37208.pdf>
- [23] BÉNÉTRIX, F. AUTRAN, J. C. Protein synthesis in grains and seeds. MOROT-GAUDRY, J. F. *Nitrogen assimilation by plants: Physiological, biochemical and molecular aspects*. Enfield, N.H.: Science Publishers, 2001, s. 343-360. ISBN 9781578081394.
- [24] WRIGLEY, C. W, BEKES, F., BUSHUK, W. Gluten: A Balance of Gliadin and Glutenin. *Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality*. St. Paul, Minn.: AACC International, ©2006, ISBN 978-189-1127-519. Dostupné z: <https://aaccpublications.aaccnet.org/doi/pdf/10.1094/9781891127519.002>
- [25] DUPONT, F. M. ALTENBACH, S. B. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science* [online]. 2003, 38(2), 133-146 [cit. 2018-07-28]. DOI: 10.1016/S0733-5210(03)00030-4. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521003000304>
- [26] ŽILIĆ, S. BARAC, M. PEŠIĆ, M. DODIG, D. IGNJATOVIĆ-MICIĆ, D. Characterization of Proteins from Grain of Different Bread and Durum Wheat Genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, 12(12), 5878-5894. DOI: 10.3390/ijms12095878. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/9/5878/>
- [27] VELÍŠEK, J. HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [28] OSBORNE, T. B. The vegetable proteins. Pp. xiii 154. 2nd edition. Monographs on Biochemistry. London: Longmans green and Co. 1924. Pric 9s. net. *Journal of the Society of Chemical Industry* [online]. 1924, 43(17), 440-440 [cit. 2018-07-28]. DOI: 10.1002/jctb.5000431704. ISSN 03684075. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.5000431704>
- [29] TRIBOI, E., MARTRE, P. TRIBOI-BLONDEL, A. M. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2003, 54(388), 1731-1742 [cit. 2018-07-28]. DOI: 10.1093/jxb/erg183. ISSN 1460-2431. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erg183>
- [30] WALTER, D. B. *Gluten: sources, composition and health effects* [online]. New York: Nova Biomedical, ©2013 [cit. 2018-07-28]. Food science and technology series (Nova

- Science Publishers). ISBN 1626183430.
- [31] EDWARDS, W. P. *The science of bakery products*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, ©2007, 259 s. ISBN 978-0-85404-486-3.
- [32] SHEWRY, P. R. TATHAM, A. S. FORDE, J. KREIS, M. MIFLIN, B. J. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *Journal of Cereal Science*. 1986, 4(2), 97-106. DOI: 10.1016/S0733-5210(86)80012-1. ISSN 07335210.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521086800121>
- [33] SKYLAS, D. J. DYK, D. VAN, WRIGLEY, C.W. Proteomics of wheat grain. *Journal of Cereal Science*. 2005, 41(2), 165-179. DOI: 10.1016/j.jcs.2004.08.010. ISSN 07335210.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521004000943>
- [34] MALIK, A. H. *Nutrient uptake, transport and translocation in cereals: Influences of environment and farming conditions* [online]. 1. Swedish University of Agricultural Sciences, 2009 [cit. 2019-01-23]. ISBN 1654-3580. Dostupné z: https://pub.epsilon.slu.se/4083/1/malik_a_091030.pdf
- [35] SHEWRY, P. R. HALFORD, N. G.; Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 2002, 947–958, Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.947>
- [36] LASZTITY, R. *The chemistry of cereal proteins*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1996. ISBN 08-493-2763-6.
- [37] WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* [online]. 2007, 24(2), 115-119 [cit. 2019-01-23]. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.004. ISSN 0740-0020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002006001535>
- [38] BATAIS, F., C. RICHARD, S. JACQUENET, S. DENERY-PAPINI, D. A. MONERET-VAUTRIN. *Wheat grain allergies: an update on wheat allergens*. European Annals of Allergy and Clinical Immunology. 2008, 40(3), 67-76. Dostupné také z: <http://www.eurannallergyimm.com/cont/journals-articles/122/volume-wheat-grain-allergies-update-allergens-321allasp1.pdf>
- [39] GROSCH, W. a H. WIESER. Redox Reactions in Wheat Dough as Affected by Ascorbic Acid. *Journal of Cereal Science* [online]. 1999, 29(1): 1-16 [cit. 2019-01-23]. DOI: 10.1006/jcrs.1998.0218. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521098902181>
- [40] HULÍN, P., DOSTÁLEK, P., HOCHÉL, I. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. *Chemické listy*. Praha, 2007, 2008(102), 327-337. ISSN 1213-7103.
- [41] WIESER, H., MANDERSCHIED, R., ERBS, M., WEIGEL, H.-J. Effects of Elevated Atmospheric CO₂ Concentrations on the Quantitative Protein Composition of Wheat Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56(15): 6531-6535. DOI: 10.1021/jf8008603. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8008603>
- [42] WIESER, H., KIEFFER, R. Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. *Journal of Cereal Science*. 2001, 34(1): 19-27. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0385. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521000903850>

- [43] SHEWRY, P., UNDERWOOD, C., WAN, Y. et al. Storage product synthesis and accumulation in developing grains of wheat. *Journal of Cereal Science*. 2009, **50**(1), 106-112. DOI: 10.1016/j.jcs.2009.03.009. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521009000484>
- [44] GIANIBELLI, M. C., LARROQUE, O. R., MACRITCHIE, F., WRIGLEY, C. W. Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Glutenin and Its Component Subunits. *Cereal Chemistry*. 2001, **78**(6), 635-646. DOI: 10.1094/CCHEM.2001.78.6.635. Dostupné z: <http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/abs/10.1094/CCHEM.2001.78.6.635>
- [45] PATIL, V. R., TALATI, J. G., SINGH, Ch., PAREKH, V. B., JADEJA G. C. Genetic Variation in Glutenin Protein Composition of Aestivum and Durum Wheat Cultivars and Its Relationship with Dough Quality. *International Journal of Food Properties* [online]. 2014, **18**(11), 2393-2408 [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.1080/10942912.2014.980948. ISSN 1094-2912. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2014.980948>
- [46] BRAUNOVÁ, MUDr Jaroslava. Potravinová alergie. *Interní medicína pro praxi*, 2001, 12: 556-558.
- [47] VERNEROVÁ, E. Výživa a alergie. *Pediatric pro praxi*, 2007, 168-172.
- [48] FRÍČ, P., ZAVORAL, M., DVOŘÁKOVÁ, T. Choroby způsobené lepkem. *Vnitřní lékařství*, 2013, 59.5: 376-382.
- [49] FRÍČ, P.M.P., KEIL, D.M.R. Celiakie pro praxi. *Medicína pro praxi*, 2011, 8(9), 354-359.
- [50] LATTA, J., et al. Celiakie—od screeningu k diagnóze. *Interní medicína pro praxi*, 2012, 14.5: 221-223.
- [51] FERNANDO, N., PANOZZO, J., TAUSZ, M., NORTON, R., FITZGERALD, G., KHAN, A., SENEWEERA, S. Rising CO₂ concentration altered wheat grain proteome and flour rheological characteristics. *Food Chemistry*. 2015, **170**, 448-454. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.044. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614010772>
- [52] DARYANTO, S., WANG, L., JACINTHE, P. A. Global synthesis of drought effects on cereal, legume, tuber and root crops production: A review. *Agricultural Water Management* [online]. 2017, **179**, 18-33 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1016/j.agwat.2016.04.022. ISSN 0378-3774. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0378377416301470>
- [53] GARCÍA DEL MORAL, L. F., Y. RHARRABTI, V. MARTOS a C. ROYO. Environmentally Induced Changes in Amino Acid Composition in the Grain of Durum Wheat Grown under Different Water and Temperature Regimes in a Mediterranean Environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, **55**(20), 8144-8151 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1021/jf063094q. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1021/jf063094q>
- [54] FAN, X. M., D. JIANG, T. B. DAI, Q. JING a W. X. CAO. Effects of post-anthesis and waterlogging on the quality of grain formation in different wheat varieties. *Chinese Journal of Plant Ecology* [online]. 2004, **28**(5), 680-685 [cit. 2019-02-02]. DOI:

- 10.17521/cjpe.2004.0091. ISSN 1005-264x. Dostupné z: <http://www.plantecology.com/EN/10.17521/cjpe.2004.0091>
- [55] YANG, F., A. D. JØRGENSEN, H. LI, et al. Implications of high-temperature events and water deficits on protein profiles in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Vinjett) grain. *Proteomics* [online]. 2011, **11**(9), 1684-1695 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1002/pmic.201000654. ISSN 16159853. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/pmic.201000654/full>
- [56] LABUSCHAGNE, M. T., O. ELAGO a E. KOEN. The influence of temperature extremes on some quality and starch characteristics in bread, biscuit and durum wheat. *Journal of Cereal Science* [online]. Elsevier, 2009, **49**(2), 184-189 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1016/j.jcs.2008.09.001. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S073352100800163X>
- [57] DANIEL, C. a E. TRIBOÏ. Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on the Grain Composition of Winter Wheat: Effects on Gliadin Content and Composition. *Journal of Cereal Science* [online]. 2000, **32**(1), 45-56 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0313. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521000903138>
- [58] WARDLAW, I. F., C. BLUMENTHAL, O. LARROQUE, C. W. WRIGLEY a E. W. R. BARLOW. Contrasting effects of chronic heat stress and heat shock on kernel weight and flour quality in wheat. *Functional Plant Biology*, 2002, **29**(1), 25-34. DOI: 10.1071/PP00147. ISSN 1445-4408. Dostupné z: <http://www.publish.csiro.au/fp/PP00147>
- [59] ZHANG, Y., X. HUANG, L. WANG, L. WEI, Z. WU, M. YOU a B. LI. Proteomic Analysis of Wheat Seed in Response to Drought Stress. *Journal of Integrative Agriculture* [online]. 2014, **13**(5), 919-925 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1016/S2095-3119(13)60601-2. ISSN 20953119. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095311913606012>
- [60] FLAGELLA, Z., M. M. GIULIANI, L. GIUZIO, C. VOLPI, S. MASCI, M. YOU a B. LI. Influence of water deficit on durum wheat storage protein composition and technological quality. *European Journal of Agronomy* [online]. 2010, **33**(3), 197-207 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1016/j.eja.2010.05.006. ISSN 11610301. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1161030110000596>
- [61] KODÍČEK, J. VALENTOVÁ, M.. *Laboratorní techniky biochemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 8070805862.
- [62] Protein Electrophoresis Methods. *Bio-Rad* [online]. 2019 [cit. 2019-02-04]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-uk/applications-technologies/protein-electrophoresismethods>
- [63] Gel Electrophoresis in Food Analysis. OTLES, Semih. *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, 2008, s. 424-433. ISBN 978-1-4200-4566-6.
- [64] Acetic Acid-Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Molecular InfoR* [online]. 2011 [cit. 2019-02-04]. Dostupné z: <http://www.molecularinfo.com/MTM/G/G1/G1-3.html>
- [65] MOREL, M. H. Acid-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Wheat Glutenins: A New Tool for the Separation of High and Low Molecular Weight Subunits. *Cereal Chemistry*.

- 1994, 71(3), 238-242. Dostupné z: http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1994/Documents/71_238.pdf
- [66] BRADOVÁ, J. a E. MATĚJOVÁ. Comparison of the Results of SDS PAGE and Chip Electrophoresis of Wheat Storage Proteins. *Chromatographia* [online]. Wiesbaden: Vieweg Verlag, 2008, **67**(Supplement 1), 83-88 [cit. 2019-02-04]. DOI: 10.1365/s10337-008-0545-2. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://link-springer-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1365/s10337-008-0545-2>
- [67] POLIŠENSKÁ, I., L. NEDOMOVÁ a S. CUPÁK. Charakterizace genotypů ovsa s využitím elektroforézy aveninů v polyakrylamidovém gelu (A-PAGE): [metodika]. Kroměříž: Agrotest fyto, 2010, 12 s. ISBN 978-80-904594-2-7.
- [68] GUPTA, R. B.; BATEY, I. L.; MACRITCHIE, F. Relationships between protein composition and functional properties of wheat flours. *Cereal Chemistry*. 1992, **69**(2), 125-131. ISSN 00090352.
- [69] ZÖRB, Christian, Elisabeth BECKER, Nikolaus MERKT, Stephanie KAFKA, Sarina SCHMIDT a Urs SCHMIDHALTER. Shift of grain protein composition in bread wheat under summer drought events. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2017, 180(1), 49-55. DOI: 10.1002/jpln.201600367. ISSN 14368730. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jpln.201600367>
- [70] ZHANG, Yu-feng, Xiu-wen HUANG, Li-li WANG, Liu WEI, Zhi-hui WU, Mingshan YOU a Bao-yun LI. Proteomic Analysis of Wheat Seed in Response to Drought Stress. *Journal of Integrative Agriculture*. 2014, 13(5), 919-925. DOI: 10.1016/S2095-3119(13)60601-2. ISSN 20953119. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095311913606012>
- [71] HLAVÁČOVÁ, M., E. POHANKOVÁ, K. KLEM a M. TRNKA. Effect of Temperature Stress and Water Shortage on Thousand Grain Weight of Selected Winter Wheat Varieties. In: *MendelNet 2015*. Brno: Mendel University in Brno, 2015, s. 43-47. ISBN 978-80-7509-363-9.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ANOVA	analýza variance
A-PAGE	kyselá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
AV ČR	Akademie věd České republiky
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
CO ₂	oxid uhličitý
ČSN	Česká technická norma
DMPN	dimethylaminopropionitril
DTT	dithiothreitol
FAR	fotosynteticky aktivní radiace
FCH VUT	Fakulta chemická Vysokého učení technického
Gln	glutamin
Gly	glycin
HCl	kyselina chlorovodíková
HMW	vysokomolekulární podjednotky gluteninů
IgA	imunoglobulin A
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti
kol.	kolektiv
LMW	nízkomolekulární podjednotky gluteninů
NASA	Národní úřad pro letectví a kosmonautiku
PAGE-SDS	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za použití SDS
PCA	analýza hlavních komponent
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
RDA	redundanční analýza
RV	relativní vlhkost
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	tetramethylethyldiamin
Tyr	tyrosin